

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de aeroalérgenos de fuentes biológicas con creciente
importancia clínica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Salvador Mas García

Directores

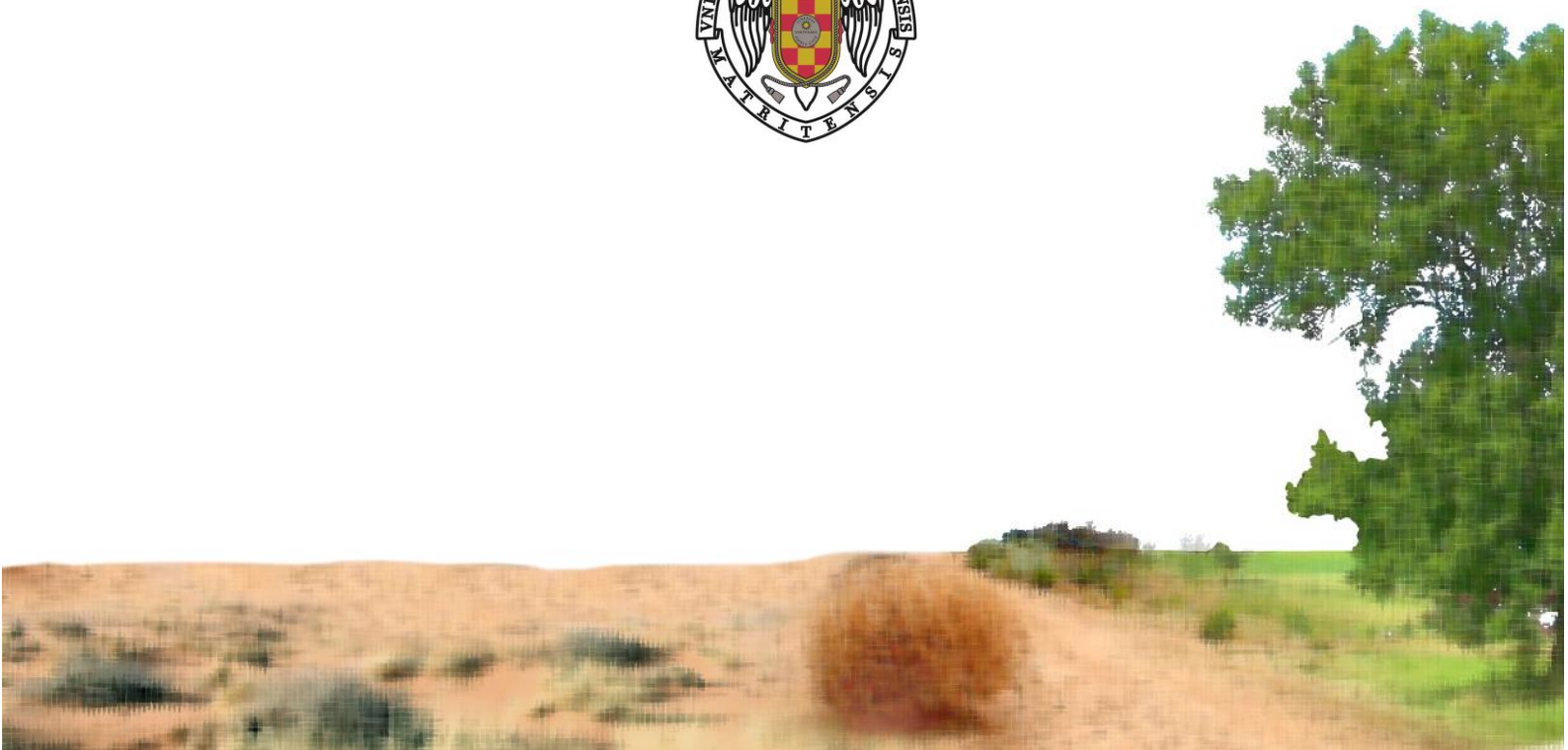
Mayte Villalba Díaz
Rodrigo Barderas Manchado

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE AEROALÉRGENOS DE
FUENTES BIOLÓGICAS CON CRECIENTE
IMPORTANCIA CLÍNICA**

SALVADOR MAS GARCÍA

MADRID 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN DE AEROALÉRGENOS DE
FUENTES BIOLÓGICAS CON CRECIENTE
IMPORTANCIA CLÍNICA**

SALVADOR MAS GARCÍA

MADRID 2014

DIRECTORES:

MAYTE VILLALBA DÍAZ

RODRIGO BARDERAS MANCHADO

ABREVIATURAS	V
SUMMARY	VII
INTRODUCCIÓN	1
1 Reacciones de hipersensibilidad	3
1.1 Factores de predisposición a las hipersensibilidades	4
1.2 Fases de la reacción alérgica	4
2 Diagnóstico clínico de las hipersensibilidades de tipo I	10
2.1 Diagnóstico clínico por componentes de las hipersensibilidades de tipo I	11
3 Tratamiento de la rinitis alérgica y el asma	12
3.1 Soluciones paliativas	12
3.2 Inmunoterapia específica con extractos alérgicos	13
4 Alérgenos del polen	15
4.1 Clasificación de pólenes alérgicos	16
4.2 Clasificación de alérgenos por familias de proteínas	18
5 Reactividad cruzada	21
6 Aplicaciones de la proteómica y la ingeniería genética al estudio de los procesos alérgicos	22
6.1 Técnicas proteómicas	22
6.2 Técnicas de clonación y producción recombinante	25

OBJETIVOS	29
Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de <i>Salsola kali</i>	31
Bloque II. Estudio del polen de <i>Fraxinus excelsior</i> como una fuente alérgica relevante en Europa	32
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1 Soluciones de uso general	37
2 Enzimas comerciales	38
3 Medios de cultivo	38
4 Anticuerpos y antisueros	39
5 Sueros de pacientes alérgicos y controles no atópicos	39
5.1 Criterios de selección	39
5.2 Procedencia de los sueros de pacientes alérgicos	40
6 Cepas de células químicamente competentes de <i>E. coli</i>	40
6.1 Aislamiento y producción de plásmidos recombinantes	40
6.2 Producción de proteínas recombinantes	41
7 Clonación del cDNA y técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	41
7.1 Geles de agarosa	41
7.2 Vectores plasmídicos	42
7.3 Obtención del RNA total del polen y síntesis de cDNA	42
7.4 Amplificación, clonación y secuenciación del DNA	43
7.5 Subclonación del cDNA en los vectores de expresión pET	45
7.6 Purificación a pequeña escala del DNA plasmídico	45
7.7 Purificación de fragmentos de DNA	46

8	Técnicas de manipulación de bacterias	46
8.1	Preparación de células <i>E. coli</i> químicamente competentes	46
8.2	Transformación de células <i>E. coli</i> One Shot TOP10	46
8.3	Transformación de células <i>E. coli</i> DH5αF' y BL21(DE3)	47
8.4	Selección de transformantes	47
9	Preparación de extractos proteicos	48
9.1	Pólenes	48
9.2	Frutos secos y frutas	48
10	Producción de alérgenos recombinantes en <i>E. coli</i>	49
10.1	Expresión a pequeña escala. Detección de la proteína recombinante	49
10.2	<i>Producción a gran escala de proteínas</i>	50
11	Aislamiento y purificación de proteínas	51
11.1	Profilinas recombinantes de <i>S. kali</i> , <i>F. excelsior</i> y <i>C. album</i>	51
11.2	Obtención de la PME natural de <i>S. kali</i>	52
11.3	Obtención de la PME recombinante de <i>S. kali</i>	52
11.4	Obtención de la PG recombinante de <i>S. kali</i>	52
12	Caracterización molecular	53
12.1	Cálculo de la concentración de proteína	53
12.2	Espectrometría de masas y secuenciación <i>de novo</i>	54
12.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)	55
12.4	Electroforesis bidimensional (2DE)	55
13	Caracterización espectroscópica	56
13.1	Espectros de absorción	56
13.2	Espectros de dicroísmo circular	57

14	Análisis estadístico	57
15	Homología de secuencia, alineamiento y modelado 3D	57
16	Caracterización inmunológica	58
16.1	ELISA indirecto	58
16.2	Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana	59
	RESULTADOS	61
	Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de <i>Salsola kali</i>	63
	ARTÍCULO I	63
	ARTÍCULO II	77
	ARTÍCULO III	91
	Bloque II. Estudio del polen de <i>Fraxinus excelsior</i> como una fuente alérgica relevante en Europa	107
	ARTÍCULO IV	107
	ARTÍCULO V	117
	DISCUSIÓN GENERAL	133
	CONCLUSIONES	143
	Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de <i>Salsola kali</i>	145
	Bloque II. Estudio del polen de <i>Fraxinus excelsior</i> como una fuente alérgica relevante en Europa	147
	BIBLIOGRAFÍA	150

2DE: electroforesis bidimensional.

2-ME: 2-mercaptoetanol.

ACN: acetonitrilo.

AIT: inmunoterapia específica con alérgenos.

Amp: ampicilina.

APC: células presentadoras de antígeno.

APS: persulfato amónico.

BA: bicarbonato amónico.

BCR: receptor de células B.

BrEt: bromuro de etidio.

BSA: albúmina de suero bovino.

DC: células dendríticas.

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato.

DEPC: dietilpirocarbonato.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DO: densidad óptica.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EXPASY: Sistema de Análisis de Proteínas del Instituto Suizo de Bioinformática.

FcεRI y FcεRII: receptor I y II de la fracción constante de IgE.

FcγR: Receptor de alta afinidad de la fracción constante de IgG.

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular I.

IL: interleuquina.

IPG: gradiente inmovilizado de pH.

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.

ITAM: motivo de activación de inmunoreceptor basado en la fosforilación de residuos de tirosina.

IUIS: Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas.

Kan: kanamicina.

LTP: proteína de transferencia de lípidos.

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica.

nsLTP: proteína de transferencia de lípidos no específica.

MALDI: ionización-desorción láser asistida por matriz.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

MOPS: 3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico.

MS: espectrometría de masas.

PBS: tampón fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PG: poligalacturonidasa.

PIP: fosfatidilinositol fosfato.

PME: pectín metilesterasa.

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

RNA: ácido ribonucleico.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SIB: Instituto Suizo de Bioinformática.

SLIT: inmunoterapia específica sublingual con alérgenos.

TBP: tributilfosfina.

TE: Tris-base con EDTA.

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina.

TFA: ácido trifluoroacético.

TNF- α : factor alfa de necrosis tumoral.

TOF: tiempo de vuelo.

VCAM-1: molécula de adhesión de células vasculares I.

WHO: Organización Mundial de la Salud.

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactopiranosido.

SUMMARY

Hypersensitivities are a group of pathologies produced as a consequence of an excessive response of the immune system. These diseases can be grouped according to the molecule or cell that produces them. The overproduction in certain individuals of immunoglobulin E, raised against molecules that are harmless for the rest of the population, is the cause of type I allergy.

Type I allergy is a generalized health problem in industrialized countries, affecting about 20 to 25% of the general population. Among allergies, those induced by pollens are one of the most widespread. It is not clear what properties make a molecule an allergen, but some characteristics like solubility, structure or stability are critical for the capability of the allergens to penetrate across the mucosal barrier and to stimulate the immune system. In the case of pollinosis, important factors increasing the allergenicity of pollens are the size, the permanence and the amount of pollen released in the atmosphere and its flowering period.

Once an allergen has penetrated the mucosal barrier, the antigen presenting cells process and expose in their surface peptides derived from the allergen. These fragments are attached to the major histocompatibility complex (MHC) establishing a MHC-II:peptide complex recognized by lymphocytes T through their T cell receptor. The allergen-specific T CD4⁺ lymphocytes mature to the Th2 phenotype and proliferate, after which they are able to activate specific B lymphocytes. Following, communication among T CD4⁺ and B cells takes place in the presence of IL4, IL13 and other co-stimulatory signals, which stimulates the synthesis of the IgE isotype in B cells.

Activated B cells mature to plasmatic cells with high IgE production capacity. These antibodies are secreted to the blood where remain anchored to the FcεRI of effector cells: mastocytes and basophiles. These steps prepare the immune system, in the so called sensitizing phase, for a new encounter with the allergen. In the challenging phase, the effector cells in the presence of allergens will release preformed molecules stored in granules and thus induce different allergic symptoms depending on the via to penetrate the organism. The synthesis of other molecules, called as secondary mediators, is initiated by the effector cells.

The induced symptoms by all these molecules are swelling of the nose, sneezing, producing of mucus, itchiness and/or red eyes in the allergic rhinitis or wheezing,

coughing, chest tightness, and/or shortness of breath in asthma. In addition, a restructuring of the mucosa epithelia takes place, which is involved in the chronicity and severity of symptoms.

The only treatment for type I allergy that modulates the course of the disease is the allergen-specific immunotherapy. It consists of a periodic administration of increasing concentrations of protein extracts of those pollens to which the patient undergoes an allergic reaction. This protocol allows decreasing the reactivity of patients through a switch in the response to the IgG isotype. Several cellular and signaling events are critical for the global desensitization process, but the key event is the counterbalance of the response to the Treg cells that modulates the disease to a tolerant phenotype, instead of the Th2 reactive phenotype.

Although immunotherapy is a good approach to cure allergy, the administration of the complete protein extract has several disadvantages: new co-sensitizations to other molecules or components in the extract are possible, different amounts of allergens among different batches or the adverse reactions of some patients in the beginning of the protocol.

The use of purified allergens from natural sources would solve the batch to batch variability, since standardized amounts of the different allergens in the extracts could be administered in desensitization protocols. Moreover, a personalized treatment in which the exact amount of the allergens or hypoallergens to which a patient is sensitized could be used, avoiding *de novo* sensitizations and reactivity to other molecules included in the pollen protein extract. On the other hand, the use of allergens produced as recombinant proteins, and the availability of different isoforms comprising a natural allergen would allow an accurate diagnosis of individual patients and thus, facilitating the preparation of adequate mixtures of allergens for a subsequent clinical treatment.

In the last years different approaches have come up to obtain new molecules with decreased IgE binding capacity but maintaining the antigenic capacity necessary for a successful immunotherapy, and associated to an increase in blocking IgG antibodies. These strategies are mainly focused on the disruption of the B cell epitopes but maintaining the T cell epitopes by using deletion variants, allergen-tandem derivatives, and mutants with modified IgE binding epitopes or hybrid molecules. Natural isoforms, which usually differ in their IgE-binding ability, provide a good approach to obtain these hypoallergenic molecules. Thus, more reliable and safer molecules can be

obtained as they are structurally similar to the sensitizing protein, with an identical 3D folding but with slightly amino acidic changes that disturb the IgE-binding ability of their IgE epitopes. Thus, these molecules are good candidates to be included in desensitization protocols.

In this context the aims of the present work are divided in two well-defined objectives:

To study and characterize relevant allergens of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen.

In the last years *S. kali* has become an important source of allergenic pollen in countries where desertification is an important issue as in middle eastern countries, USA and Southern Europe.

We have here studied and characterized novel allergens or useful allergenic molecules for diagnosis and clinical treatment of pollinosis.

- The analysis by 2DE of the pollen protein extract by using a polyclonal antiserum raised against profilin and sera from allergic patients, showed different patterns in the IgG- and IgE-binding ability of a group of profilin isoforms. To gain further insight into the structural properties of these highly conserved isoform molecules, we aimed the following objectives:
 - To clone and sequence several isoforms present in the pollen protein extract of *S. kali* and produce the recombinant molecules in *Escherichia coli* as non-fusion proteins.
 - To characterize structurally and immunologically the isoforms obtained and to compare them with rChe a 2, the profilin from *Chenopodium album*, using a polyclonal antiserum and IgE from sera of allergic patients.
 - To identify the possible amino acid substitutions that make one of the isoforms a molecule with a reduced IgE-binding ability based on the previously described epitope mapping of this family of allergens.
- Allergy to *S. kali* can be diagnosed through the use of the major allergen and specific sensitization marker Sal k 1. However, the natural allergen is purified with very low yield and the complex isoforms pattern of Sal k 1 found in the pollen protein extract complicate the diagnosis of allergic patients. Then, the aim of this part of the work was:

- To clone, sequence and produce as a recombinant protein one isoform able to span the immunological characteristics of all the isoforms present in the natural protein.
 - To characterize the recombinant isoform using monoclonal antibodies, a polyclonal antiserum and sera from patients from three different regions of Spain and the natural protein isolated from *S. kali* pollen to validate the use of the recombinant molecule for diagnosis and future desensitization protocols.
 - To analyze pollen-food cross-reactivity processes using the recombinant protein as model.
- Although five allergens have been already identified in *S. kali* pollen, the analysis by 2DE reveals the presence of IgE-binding protein spots remaining to be identified and characterized. The third part of the work focused on *S. kali* pollen was directed to the identification and characterization of one of these IgE-binding molecules with the main aims related to:
 - To identify by *de novo* sequencing mass spectrometry the IgE-binding spots and obtain the nucleotide sequences corresponding to this potential allergen.
 - To clone and produce as a recombinant protein the polygalacturonase (PG) previously identified and sequenced.
 - To characterize the structural and immunological properties of this allergen by using sera of allergic patients to *S. kali* and a specific polyclonal antiserum obtained against the recombinant PG.

To study ash (*Fraxinus excelsior*) pollen as a relevant allergenic source in Europe.

Although *F. excelsior* is widely distributed in Northern and Central Europe, its clinical significance has been undervalued because its pollination period overlaps with that of Betulaceae. As a consequence, the allergenic protein profile of ash has not been well characterized. The approaches used to accomplish this objective were:

- To perform an extensive immunoproteomic analysis by two-dimensional electrophoresis of ash pollen extract by using polyclonal antibodies raised against the homologous allergens in *Olea europaea* as well as sera from allergic patients to *F. excelsior*.

- To determine the amino acid sequence identity between the two sources of the Oleaceae family by using the cDNA-encoding sequences of the allergens.
- To analyze the cross-reactivity between the allergenic proteins from olive and ash pollens.
- To evaluate the prevalence of the allergens identified in the protein profile of *F. excelsior* through the use of the natural purified allergens from olive.
- To clone and produce as a recombinant protein the panallergen profilin from *F. excelsior* pollen. To validate the recombinant profilin and polcalcin obtained from *F. excelsior* against the natural counterparts by using polyclonal antibodies and sera from allergic patients to ash.
- To characterize the cross-reactivity of profilin and polcalcin from ash pollen.

In summary, in the first group of studies of the present work, the characterization of several allergens from *S. kali* has been accomplished. First, two isoforms of profilin from *S. kali* pollen (one of them a hypoallergenic natural protein) have been produced as recombinant molecules. These molecules should improve their characterization and the identification of those properties that could make a molecule with the same IgG-binding ability an allergen with reduced capability to bind IgE antibodies. Second, one isoform of the allergenic marker of *S. kali*, Sal k 1, has been obtained as a recombinant protein and extensively characterized demonstrating that this molecule could substitute the polymorphic protein isolated from the pollen in the diagnosis of *S. kali* allergy. According to recently published studies, Sal k 1 prevalence is higher in patients sensitized to plant-derived food and pollen than in patients only sensitized to pollens. Here, we have confirmed the possible role of Sal k 1 in pollen and plant-derived food cross-reactivity processes by IgE-inhibition assays using the recombinant proteins. Third, a new allergen from *S. kali* has been identified, cloned, produced as a recombinant molecule and assessed to be involved in the plant-derived food and pollen polysensitization syndrome.

In the second group of studies of the present work, the allergenic profile of *F. excelsior* has been studied by using an immunoproteomic approach combined with IgE-inhibition assays and the analysis of the cDNA-encoding allergen sequences. The here presented results demonstrated the high cross-reactivity processes observed between

both species of the Oleaceae family (ash and olive), as a consequence of the high amino acid sequence similarity between these closely related sources. In combination, these data suggest the indistinct use of the purified allergens from ash or olive pollen for diagnosis of these allergies. For treatment, the most prevalent pollen extract in the living area of the sensitized patient should be used.

Finally, two molecules involved in the polysensitization processes between different pollens and pollen and plant-derived foods have been obtained as recombinant proteins and characterized against their natural counterparts. Polcalcin and profilin allergens from *F. excelsior* pollen could be useful to simplify the identification of the primary sensitizing agent in areas with complex sensitization profiles.

In conclusion, this work has got further insights into the allergenic molecules that might improve the diagnosis of pollinosis to *S. kali* and *F. excelsior* certain allergenic sources by identifying and characterizing molecules that could be useful for personalized clinical treatment of allergy by immunotherapy.

INTRODUCCIÓN



1 Reacciones de hipersensibilidad

Denominadas originalmente como alergias [1], las reacciones de hipersensibilidad agrupan una serie de patologías en las que se produce una respuesta excesiva y alterada del sistema inmune frente a una molécula que generalmente es de carácter inocuo para el organismo. En estas patologías intervienen anticuerpos y/o células, pudiendo clasificarse en cuatro tipos en función del agente mediador de la respuesta [2] (**Tabla 1**).

Tipos	Respuesta inmune	Patologías asociadas
Hipersensibilidad de tipo I	Respuesta humoral (IgE)	Polinosis
		Asma inducido por aeroalérgenos
		Choque anafiláctico
Hipersensibilidad de tipo II	Respuesta humoral (IgG y sistema del Complemento)	Anemia hemolítica
		Miastenia gravis
Hipersensibilidad de tipo III	Respuesta humoral (Inmunocomplejos)	Alveolitis alérgica extrínseca
		Lupus eritematoso sistémico
Hipersensibilidad de tipo IV	Respuesta celular (Linfocitos T)	Dermatitis por contacto
		Diabetes insulín dependiente

Tabla 1: resumen de las reacciones de hipersensibilidad.

Las hipersensibilidades de tipo I, denominadas actualmente como alergias, son producidas por moléculas capaces de iniciar una respuesta inmune. Estas moléculas son componentes básicos de múltiples y variadas fuentes biológicas, siendo inocuas para la mayoría de la población en las cantidades en las que se encuentran normalmente. Sin embargo, existen individuos con cierta predisposición genética capaces de sufrir una respuesta inmunológica aberrante y exagerada frente a estos alérgenos [3]. Estos individuos, denominados atópicos, muestran susceptibilidad a padecer ciertas patologías que, aunque denominadas tradicionalmente en función del órgano al que afectan (*e.g.* rinitis, asma o eczema), se encuentran estrechamente relacionadas [4, 5].

La polinosis o fiebre del heno está incluida dentro de las hipersensibilidades de tipo I (**Tabla 1**) y se considera un desorden inmunológico asociado al tracto respiratorio. Alrededor de un 20-25% de la población mundial sufre los síntomas de esta enfermedad [6], viéndose particularmente afectados los niños [7] y observándose durante las últimas décadas un incremento significativo de su prevalencia en los países desarrollados [8]. Esta patología está provocada por la inhalación del polen que producen determinados vegetales y está mediada por un exceso de producción de moléculas solubles,

considerándose por tanto una respuesta de tipo humoral. Fue en 1960 cuando se aisló e identificó la inmunoglobulina E (IgE) como causante de la reacción alérgica [9].

1.1 Factores de predisposición a las hipersensibilidades

Existen diversos factores que predisponen a padecer estas enfermedades. Así, existe un componente genético implicado en este tipo de respuesta, ya que entre un 5 y un 15% de los niños con padres no atópicos pueden sufrir esta enfermedad, incrementándose la probabilidad hasta un 80% cuando los padres son atópicos [10]. Algunos factores externos pueden favorecer estas enfermedades, el humo del tabaco, partículas derivadas de la combustión de materiales fósiles [11, 12] o la exposición a determinados patógenos que pueden provocar un cambio en el balance entre las respuestas Th1 y Th2 [13]. Por último, la presencia de determinados alérgenos y los niveles de éstos a los que se encuentra expuesto un individuo también son factores críticos, ya que una mayor exposición favorece el inicio de una respuesta alérgica.

1.2 Fases de la reacción alérgica

Los procesos alérgicos se manifiestan en dos etapas: i) fase de sensibilización inicial frente al antígeno y ii) fase de manifestación clínica de la enfermedad, la cual está provocada por una exposición posterior a la molécula antigénica una vez sensibilizado el individuo (**Figura 1**).

En el caso de la polinosis, el alérgeno es captado a través del epitelio de las mucosas del aparato respiratorio por las células presentadoras de antígeno (APC), que lo procesan y exhiben fragmentos en su superficie celular a los linfocitos T, iniciándose así el proceso de sensibilización. Pueden actuar como APC los macrófagos, linfocitos B, algunas células epiteliales y las células dendríticas, siendo estas últimas las más importantes, pues tienen una elevada capacidad para procesar los antígenos y estimular a los linfocitos T. La provocación de los síntomas alérgicos ocurre por una posterior exposición al alérgeno, pudiéndose observar en esta etapa dos fases: la inmediata y la tardía (entre 2 y 8 horas tras la exposición al alérgeno).

1.2.1 Sensibilización frente al antígeno

En la primera etapa de la respuesta alérgica se produce una sensibilización frente al antígeno, el cual es inhalado y llega hasta la mucosa del sistema respiratorio. Allí, las APC, fundamentalmente células de Langerhans [14], captan estas moléculas y viajan

hasta el tejido linfoide nasofaríngeo (NALT) o al tejido linfoide broncoalveolar (BALT). Las moléculas captadas son procesadas en el interior de las APC y pequeños fragmentos derivados de aquellas quedan unidos al complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II). De esta manera, se presentan en la superficie celular péptidos de entre 12 a 16 aminoácidos derivados del alérgeno a los linfocitos T $CD4^+$. Estas células rastrean la superficie de las APC con su receptor de células T (TCR), que reconoce el MHC-II y los fragmentos que estas moléculas llevan unidos. Los linfocitos T $CD4^+$ específicos del alérgeno capturado iniciarán su activación y expansión clonal mediada por IL-4 para diferenciarse a linfocitos Th2.

Tras la activación de las células Th2, éstas estimulan la proliferación de los linfocitos B específicos del alérgeno en presencia de IL4 e IL13, los cuales inician la síntesis de IgE.

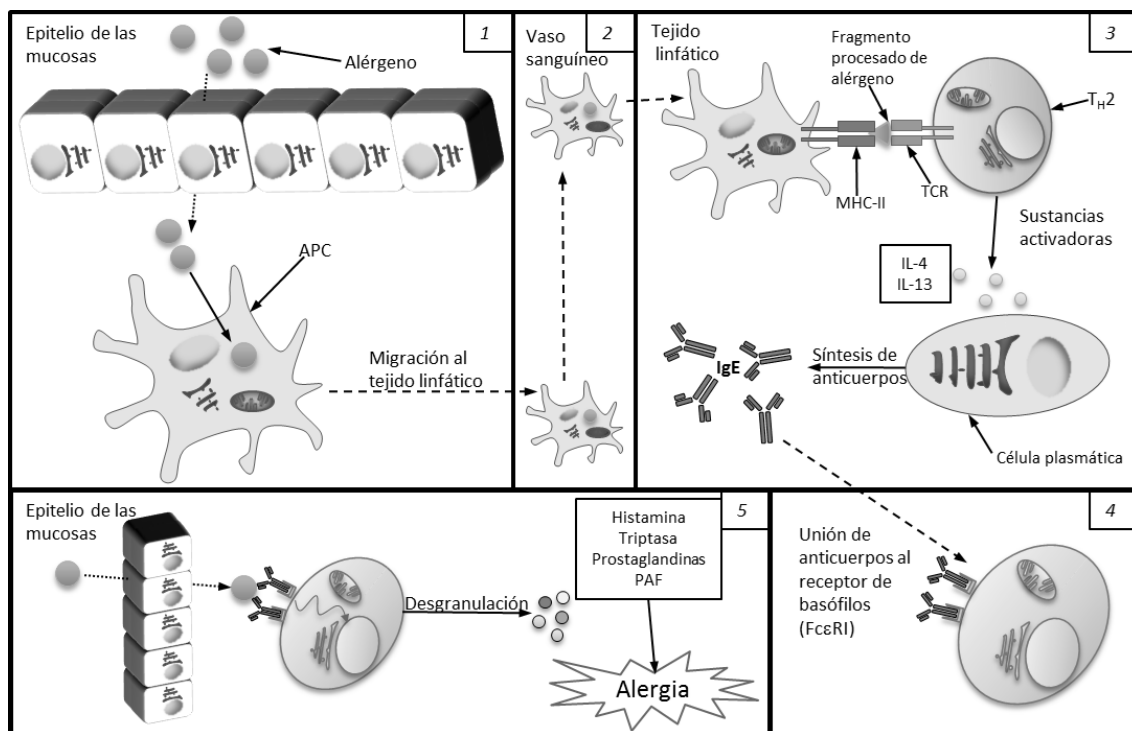


Figura 1: resumen esquemático del proceso de sensibilización (1-4) y posterior exposición al alérgeno (5).

En esta primera fase de sensibilización, la producción de IgE específica del alérgeno por las células plasmáticas prepara al sistema inmune de las mucosas para posteriores encuentros con el alérgeno. La fracción constante de la IgE sintetizada es reconocida por el receptor $Fc\epsilon RI$ de basófilos y mastocitos, quedando anclada a la superficie de estas células.

1.2.1.1 Complejo mayor de histocompatibilidad y presentación del antígeno

Existen dos grandes grupos de estas moléculas, MHC-I y MHC-II, presentando ambos un elevado polimorfismo. El primero de estos grupos se encuentra en todas las células del organismo (excepto en algunos casos como los eritrocitos) y el segundo únicamente en las APC. Están formados por proteínas de membrana compuestas por 2 cadenas polipeptídicas, una alfa que contiene 2 y 3 dominios, en MHC-II y I respectivamente, y una beta formada por 1 y 2 dominios tipo inmunoglobulina, en MHC-I y II respectivamente. Estos complejos quedan anclados a la membrana celular a través de la cadena alfa en el caso de MHC-I y a través de las cadenas alfa y beta en el caso de MHC-II. Ambos albergan una hendidura en la cual se alojará un péptido de entre 8 y 11 aminoácidos en el MHC-I y entre 12 y 26 aminoácidos en el MHC-II [15].

El elevado grado de polimorfismo del MHC existente entre la población, así como su intervención directa en el proceso de sensibilización a determinados antígenos, podría estar implicado en el hecho de que algunos individuos sean más propensos a sensibilizarse frente a unos u otros alérgenos. Determinados estudios poblacionales de los alelos MHC presentes en pacientes atópicos y no atópicos, muestran una relación significativa entre la presencia de unos alelos MHC, como por ejemplo los alelos DR7 o DQ2, y el desarrollo de la alergia [16-21].

1.2.1.2 Linfocitos B y cambio de isotipo a inmunoglobulina E

La estructura básica de las inmunoglobulinas se compone de una fracción constante que va a determinar qué respuesta efectora van a mediar, y una fracción variable que va a determinar la especificidad del anticuerpo (**Figura 2**). En el caso de la alergia de tipo I es el isotipo E el que se encuentra implicado en las respuestas frente a alérgenos. La inmunoglobulina E es el isotipo que tiene los niveles más bajos de todos los circulantes en el plasma, incrementándose sus concentraciones hasta los 10-15 años de edad del individuo y produciéndose una disminución progresiva durante la madurez [22]. Sin embargo, los niños atópicos tienen un incremento más abrupto de la concentración de IgE.

El proceso de maduración de un linfocito B conlleva un cambio de isotipo. Inicialmente, los linfocitos B que todavía no han madurado expresan en la superficie celular el isotipo IgM asociado a CD79 (denominándose al complejo IgM-CD79 como BCR) y migran a los tejidos linfoides secundarios (bazo, nódulos linfáticos, etc...). En

estos tejidos pueden actuar como APC de aquellos antígenos que reconocen su BCR, iniciándose el proceso de maduración si recibe las señales necesarias. La maduración implica una serie de variaciones entre las que se encuentra el cambio a uno de los isotipos de inmunoglobulina, que en el caso de la IgE requiere fundamentalmente dos señales complementarias:

- La presencia de IL4 o IL13, actuando respectivamente a través de sus correspondientes receptores IL4R e IL13R lo cual produce una activación vía STAT6 de la transcripción de la fracción constante correspondiente al isotipo IgE.
- La unión de CD40, presente en las células B, a su ligando CD40L en linfocitos T, activándose la recombinación somática del DNA en las células B.

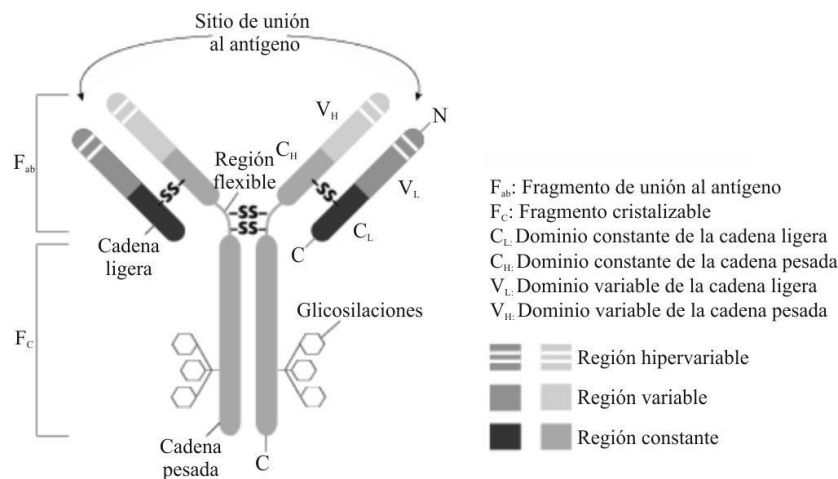


Figura 2: representación de la estructura de una molécula de inmunoglobulina.

CD40 e IL4 además activan de manera conjunta la expresión de la enzima desaminasa inducida por activación, implicada en las reacciones de hipermutación somática (introducción de mutaciones puntuales en las secuencias génicas que codifican las regiones variables) y en el cambio de isotipo (cambio por recombinación somática en las secuencias génicas que confieren funciones efectoras específicas al anticuerpo) [23]. Aunque este proceso de cambio de isotipo se produce en órganos linfoides, se ha observado que también puede ocurrir en las mucosas del aparato respiratorio de individuos alérgicos [24].

1.2.1.3 Receptores celulares de inmunoglobulina E

La función efectora de la IgE depende en cierta manera de su anclaje a la membrana de ciertos tipos celulares. Existen dos tipos de receptores de la fracción constante de IgE: los de baja afinidad (FcεRII), localizados en la superficie celular de linfocitos B y

los de alta afinidad (FcεRI). Éstos últimos se expresan en mastocitos y basófilos en forma de tetrámero ($\alpha\beta\gamma_2$) (**Figura 3**) y en APCs en forma de trímero ($\alpha\gamma_2$), siendo la subunidad β la que lleva a cabo la señalización una vez activado el receptor. La unión de IgE al FcεRI incrementa la duración media del receptor en la superficie de la célula, de tal manera que este complejo IgE- FcεRI puede quedar anclado durante toda la vida de la célula [25].

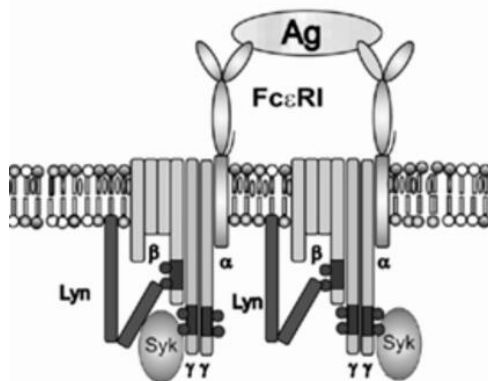


Figura 3: esquema de un antígeno (Ag) reconocido por 2 moléculas de IgE ancladas a su FcεRI en la superficie de una célula efectora. Modificado de [26].

La subunidad α tiene un dominio extracelular al cual queda anclada la inmunoglobulina a través de la fracción constante. La subunidad β se encuentra asociada a la quinasa Lyn y tiene un único dominio ITAM, al igual que la subunidad γ . Los dominios ITAM son regiones que contiene residuos fosforilables y que permiten modular la activación de este receptor mediante fosforilación. Cuando se produce la agregación de los receptores FcεRI a través de las moléculas de IgE que han unido su antígeno, Lyn fosforila los dominios ITAM de las subunidades β y γ , que reclutan a la quinasa Syk, iniciándose así una cascada de señalización que lleva a la activación de basófilos y mastocitos [27, 28].

1.2.1.4 Reclutamiento celular

El hecho de que la respuesta inmune frente a un alérgeno sea tan rápida y eficaz, requiere que las células encargadas de mediar esta respuesta se localicen en el lugar adecuado. Así, el reclutamiento de mastocitos y basófilos, cargados de IgE en su superficie celular y localizados en las mucosas expuestas al alérgeno y en los tejidos colindantes permite desencadenar el proceso inmediatamente después de una posterior exposición al alérgeno. Además, durante la fase tardía, las células que inicialmente reconocen el alérgeno en este epitelio, secretan mediadores de inflamación y citoquinas que potencian el estado de activación celular (IL3, IL4, IL5, IL8, GM-CSF y TNF- α

[29]). Estas moléculas proinflamatorias inician una cascada de eventos que inducen la exposición en la superficie de las células del endotelio vascular de moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1, fundamentalmente) favoreciendo la migración de células inflamatorias [30].

Durante la fase tardía prevalece la infiltración celular provocando un efecto más agresivo sobre el epitelio en el que se localiza el alérgeno, lo que incrementa la cronicidad de la enfermedad. Se ha observado que el pretratamiento con anticuerpos anti-ICAM-1 reduce los síntomas de esta fase así como la infiltración de eosinófilos [31], mediadores en esta etapa del proceso alérgico.

1.2.2 Provocación y liberación de sustancias mediadoras

Como se ha comentado previamente, las células efectoras provistas con la IgE específica frente al alérgeno se localizan en la piel, mucosas o asociadas a los vasos sanguíneos. Cuando varias moléculas de IgE adyacentes reconocen su epítipo en el alérgeno, se produce una agregación de los FcεRI, iniciándose una cascada de señalización que liberará inmediatamente una serie de mediadores preformados contenidos en gránulos. Posteriormente, se producirá la síntesis *de novo* de otras sustancias mediadoras secundarias (**Tabla 2**).

Este repertorio de moléculas mediadoras interactúa con el tejido vascular y nervioso aumentando el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso, provocando síntomas diferentes según en qué tejido se produzca su liberación. En el caso de la polinosis, la secreción de mediadores en las mucosas del sistema respiratorio produce los síntomas de alergia dando lugar a las siguientes patologías:

- Rinitis alérgica: inflamación de la mucosa nasal que provoca estornudos, lagrimeo, producción excesiva de moco o conjuntivitis. Entre un 16 y un 19% de la población mundial padece estos síntomas [6].
- Asma: enfermedad inflamatoria crónica pulmonar. Aparecen toses, dificultad para respirar, opresión torácica y sibilaciones producidas por los pulmones. El 40% de los pacientes con rinitis alérgica que no son tratados, o tratados de forma incorrecta, acaba desarrollando asma [32, 33] y un 75% de los pacientes asmáticos son debidos a procesos de reactividad frente a alérgenos inhalados [34].

Primarias	Histamina		
	Proteoglicanos (heparina, condroitín sulfato)		
	Proteasas (triptasa, quimasa)		
Secundarias	Lipídicos	Derivados del ácido araquidónico	Leucotrienos (LTB ₄ , LTC ₄ , LTE ₄) Prostaglandinas (PG ₂)
		Derivados de la fosfatidilcolina	Factor activador de plaquetas (PAF)
	Proteicos	Citoquinas (IL1, IL3, IL4, IL6, TNF- α , GM-CSF)	

Tabla 2: resumen de las sustancias mediadoras liberadas por mastocitos y basófilos responsables de las manifestaciones clínicas de las alergias de tipo I.

2 Diagnóstico clínico de las hipersensibilidades de tipo I

Para la correcta gestión clínica de las alergias es indispensable un diagnóstico precoz y evitar en la medida de lo posible que el paciente se encuentre expuesto a los alérgenos a los que éste se encuentra sensibilizado.

Actualmente, el procedimiento clínico más utilizado para el diagnóstico de las hipersensibilidades de tipo I, además de una historia clínica exhaustiva, es el denominado *prick test*, en el que mediante el uso de las diferentes sustancias susceptibles de provocar alergia (extractos proteicos de pólenes, alimentos, epitelios de animales, ácaros, hongos, venenos de insectos, látex o fármacos) se puede determinar si el paciente presenta reactividad frente a éstas. Para ello, se realizan una serie de punciones superficiales en el antebrazo o la espalda del paciente sobre las cuales se coloca en distintas posiciones una gota de los diferentes extractos con los que se van a realizar las pruebas. Tras unos 20 minutos, aquellas sustancias a las cuales el paciente se encuentra sensibilizado, habrán estimulado al sistema inmune provocando la activación de mastocitos y basófilos que liberarán sustancias preformadas provocando una inflamación y enrojecimiento denominados como pápula. Esta inflamación que se puede medir, indicará la estimulación positiva de alguno de los componentes de los extractos aplicados.

En pacientes que sufren procesos asmáticos derivados de la exposición a alérgenos (alrededor de un 75% de los pacientes que padecen asma) se pueden realizar pruebas de provocación bronquial específica con extractos alérgicos [34]. Tras la provocación se

miden parámetros que determinan el grado de inflamación como son el óxido nítrico o el dióxido de carbono. Los pacientes que se encuentran sensibilizados a alguno o varios de los alérgenos administrados pueden sufrir una respuesta inmediata (síntomas visibles en 20 minutos) y/o una respuesta tardía (observada entre las 6 y las 12 horas tras la provocación).

Existen también en el mercado unos discos que contienen distintas sustancias químicas que se colocan en la espalda del paciente y se mantienen durante 48 horas para provocar una posible reacción. En este caso las sustancias susceptibles de provocar alergia que se utilizan suelen ser determinados materiales, metales o productos químicos que provocan reacciones cutáneas y por tanto son pruebas para el diagnóstico de dermatitis atópica o alergia por contacto (hipersensibilidad de tipo IV).

2.1 Diagnóstico clínico por componentes de las hipersensibilidades de tipo I

Las fuentes biológicas de alérgenos son, generalmente, mezclas complejas de proteínas en las que se encuentran moléculas alergénicas principales (aquellas que presentan más de un 50% de pacientes sensibilizados), secundarias (aquellas que presentan menos de un 50% de pacientes sensibilizados), alérgenos con reactividad cruzada y otros componentes no descritos como alergénicos. La enfermedad alérgica es por tanto una patología muy heterogénea en la que los pacientes presentan distintos fenotipos clínicos y patrones de sensibilización. El uso de extractos proteicos derivados de las fuentes alergénicas en el diagnóstico presenta el problema de que no es capaz de resolver, a nivel de los distintos componentes, los alérgenos frente a las que el paciente se encuentra sensibilizado. Además, la administración correcta de un protocolo de desensibilización delimitándolo a aquellos alérgenos a los que el paciente sufre reacciones alérgicas, e indicar de forma precisa al paciente qué fuentes alergénicas (fundamentalmente alimentos) debe evitar, requiere un conocimiento preciso de aquellas moléculas alergénicas frente a las que un paciente se encuentra sensibilizado.

El uso de los alérgenos naturales purificados o alérgenos recombinantes equivalentes a los encontrados en las fuentes alergénicas permite cuantificar los niveles de IgE específica que tiene un paciente en el suero. En la actualidad existen gran cantidad de artículos que hacen referencia al uso, fundamentalmente de *microarrays*, como plataforma para implementar los alérgenos purificados para llevar a cabo la determinación de los niveles específicos de IgE [35]. Aunque en muchos casos es de

gran utilidad [36-40], el diagnóstico de alergia basado en componentes requiere de una mayor comprensión de la relación existente entre los niveles de IgE presentes en el suero y los síntomas sufridos por los pacientes. Adicionalmente, los niveles de IgE y de IgG pueden determinarse mediante estas plataformas de alérgenos para monitorizar el progreso de los protocolos de desensibilización y modular, durante el transcurso de la terapia, los alérgenos con los que está siendo tratado el paciente.

3 Tratamiento de la rinitis alérgica y el asma

Actualmente el tratamiento de la enfermedad alérgica consiste fundamentalmente en evitar la exposición al alérgeno, la medicación con fármacos y la inmunoterapia específica con extractos alérgicos (AIT). De éstos, la AIT es hasta el momento la única terapia que actúa sobre la causa directa que provoca las reacciones alérgicas y que por tanto puede modular el progreso de la enfermedad.

3.1 Soluciones paliativas

Existen en el mercado una amplia variedad de medicamentos dirigidos a evitar o disminuir los síntomas de la rinitis alérgica y el asma actuando sobre diferentes vías implicadas en los procesos alérgicos. Se denominan paliativas ya que no eliminan la enfermedad:

- Antihistamínicos: actúan como antagonistas del receptor H1 de histamina. Bloquean la acción de la histamina liberada por basófilos y mastocitos tras la provocación del sistema inmune frente a un alérgeno.
- Corticoesteroides: éstos actúan como inmunosupresores, interrumpiendo o previniendo reacciones del sistema inmune mediadas por células. Actualmente son el mejor tratamiento para el asma.
- Broncodilatadores: en algunos pacientes con asma, las vías respiratorias se cierran por contracción del músculo liso durante la reacción alérgica. Estos fármacos actúan relajando este músculo, evitando así la oclusión de las vías respiratorias.
- Descongestionantes: estos medicamentos actúan de forma rápida constriñendo los vasos sanguíneos, reduciendo el flujo de sangre y por tanto la cantidad de fluido mucoso en la nariz.

- Anticuerpos anti-IgE: se trata de anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la fracción constante de la IgE. Este fármaco se une a las moléculas de inmunoglobulina de forma que evita su unión a los receptores FcεRI, previniendo que basófilos y mastocitos liberen las sustancias mediadoras de los síntomas de la alergia.

3.2 Inmunoterapia específica con extractos alérgicos

La AIT fue introducida por primera vez hace 100 años como un mecanismo para inducir una reducción de la respuesta alérgica en individuos con hipersensibilidad [41]. Se trata de un procedimiento terapéutico en el que se administran periódicamente, vía subcutánea mediante inyecciones o sublingual mediante gotas o pastillas (SLIT), dosis crecientes de aquellos extractos alérgicos a los que el paciente está sensibilizado [42], junto con adyuvantes como el hidróxido de aluminio que pretenden modular la respuesta del sistema inmune. El tratamiento consiste en un incremento gradual de la dosis administrada de estos extractos alérgicos con el fin de provocar una desensibilización del paciente. En general, se administra el extracto proteico con la totalidad de los alérgenos que lo componen, frente a algunos de los cuales no se encuentra sensibilizado el paciente, así como otras proteínas no alérgicas o componentes de tipo no proteico con el agravante de que el contenido puede cambiar cuantitativamente según el lote utilizado. Además, las terapias tienen una duración de al menos 3 años y los beneficios y la eficacia son cuestionables en algunos casos. El uso, en el futuro, de alérgenos recombinantes o alérgenos purificados de la fuente natural permitiría solventar algunos de estos problemas, ya que se podrían administrar cantidades controladas de los alérgenos a los que está sensibilizado el paciente, eliminando del tratamiento aquellas moléculas que pudiesen distorsionar la efectividad de estos protocolos. El uso de los alérgenos recombinantes tendría la ventaja adicional de obtener los alérgenos en grandes cantidades en el laboratorio, solventándose así el problema de los bajos rendimientos obtenidos en la purificación de alérgenos de la fuente natural.

La base de actuación del tratamiento de desensibilización consiste en que aunque la reacción alérgica está mediada por anticuerpos IgE, éste no es el único isotipo que un paciente produce frente a un alérgeno. Se ha observado que existen en el suero de individuos alérgicos que no han recibido AIT, pequeñas cantidades de IgG específica

frente al alérgeno junto con grandes cantidades de IgE. Además, pacientes que están siendo tratados con inmunoterapia muestran un incremento gradual significativo (entre 10 y 100 veces) en la producción de IgG [43-45]. Esta IgG es fundamentalmente del isotipo 4 (IgG4) y tiene unas características especiales, como una baja afinidad por los receptores Fc γ y capacidad de activación disminuida del sistema del complemento. Éstas y otras propiedades hacen que este isotipo bloquee la unión del alérgeno a las IgE presentes en los receptores Fc ϵ RI de basófilos y mastocitos, previniendo así su desgranulación. Parece por tanto que la efectividad y el éxito de los protocolos de desensibilización dependen, entre otros componentes del sistema inmune, de los anticuerpos bloqueantes IgG [46, 47].

A nivel celular la efectividad del mecanismo de actuación de la inmunoterapia dependerá de si el balance existente entre las células T reguladoras (Treg) y las células Th2 se inclina hacia las primeras. Así, la estimulación de las células Treg modularía la respuesta del sistema inmune por varias vías: i) inhibiendo a las células B productoras de IgE específica del alérgeno y promoviendo la proliferación y supervivencia de células B productoras de IgG bloqueante; ii) suprimiendo a las células dendríticas (DC) inflamatorias e induciendo las DC productoras de IL10 y iii) suprimiendo la proliferación de las células Th17 y Th1 [48, 49] (**Figura 4**).

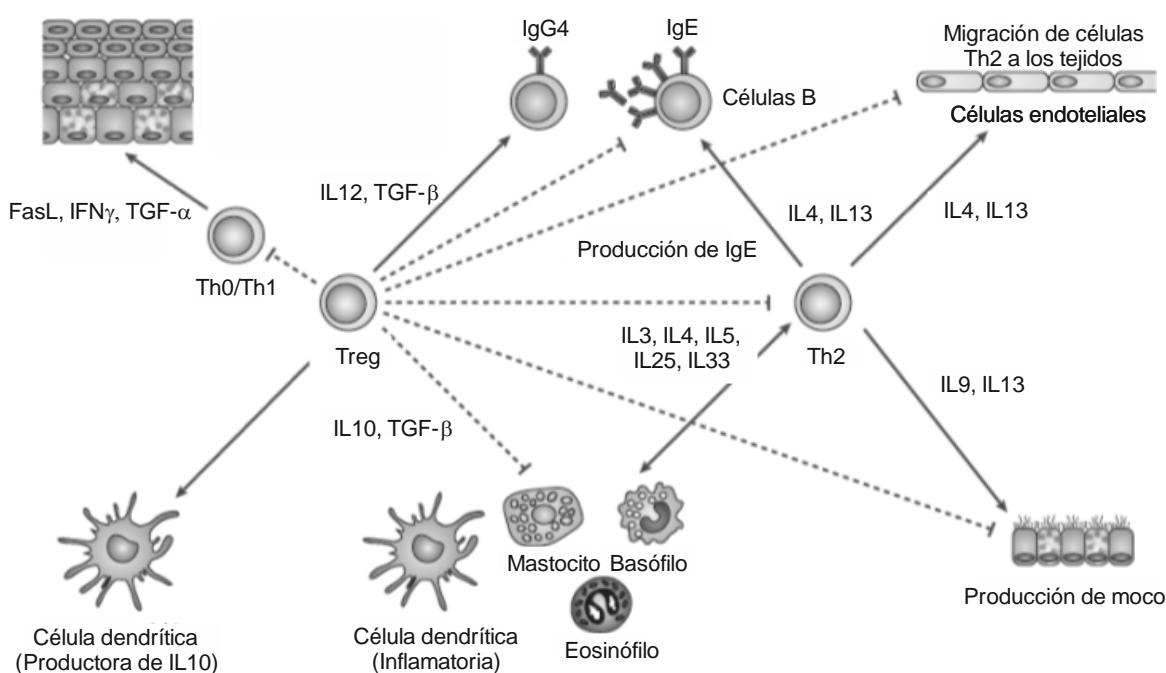


Figura 4: proceso de desensibilización mediado por células Treg a través de IL10 y TGF- β .

Modificado de Akdis and Akdis [49].

Algunos protocolos de desensibilización mediante la administración de proteínas naturales purificadas, alérgenos recombinantes o el extracto proteico de polen aplicados en pacientes alérgicos, han confirmado la efectividad de este tipo de inmunoterapia [50]. Fundamentalmente, se ha observado un incremento en los niveles de IgG bloqueante y la ausencia de nuevas co-sensibilizaciones mediadas por IgE en aquellos pacientes que recibieron inmunoterapia con alérgenos purificados. Los beneficios del uso de alérgenos naturales o recombinantes en inmunoterapia son claros, pero todavía se han de realizar más estudios para confirmar que éstos mejoran la eficacia y seguridad de los protocolos de desensibilización [51].

4 Alérgenos del polen

Generalmente las moléculas capaces de iniciar una respuesta alérgica son de tipo proteico, aunque en algunos casos, los carbohidratos, que aparecen como grupo prostético en las cadenas polipeptídicas de algunas proteínas, se han identificado como parte de epítomos alérgicos [52]. Por otra parte, algunas sustancias químicas de bajo peso molecular, naturales o sintéticas, pueden actuar como coestimuladoras. Estas moléculas denominadas haptenos son capaces de conjugarse con otras moléculas, generalmente proteínas del organismo, constituyendo así un antígeno capaz de ser reconocido por el sistema inmune.

No está muy claro qué características hacen de los alérgenos, inocuos para la mayoría de la población, moléculas alérgicas. Aspectos como el tamaño, la estructura, la estabilidad o la solubilidad influyen en la capacidad de estos alérgenos para estimular el sistema inmune. Además, en el caso de los alérgenos que acceden al organismo por las vías respiratorias (epitelios, hongos o polen) otro factor determinante en su alergenidad es el diámetro de la partícula en la cual se propaga. Cuanto mayor sea ésta, menor va a ser su permanencia en el aire, ya que sedimentará por gravedad más rápidamente que una partícula de menor tamaño, influyendo también el tamaño en un mayor o menor acceso a las mucosas del sistema respiratorio.

En el caso concreto de la exposición a alérgenos del polen, las partículas responsables del transporte de las moléculas alérgicas aparecen en el aire de forma estacional dependiendo de la época de polinización de la planta que los origina. El polen deshidratado es secretado por la planta con el objetivo de alcanzar el tubo polínico para

llevar a cabo su función biológica y puede ser inhalado llegando a las mucosas del tracto respiratorio, donde se hidrata y se liberan los alérgenos [53-55].

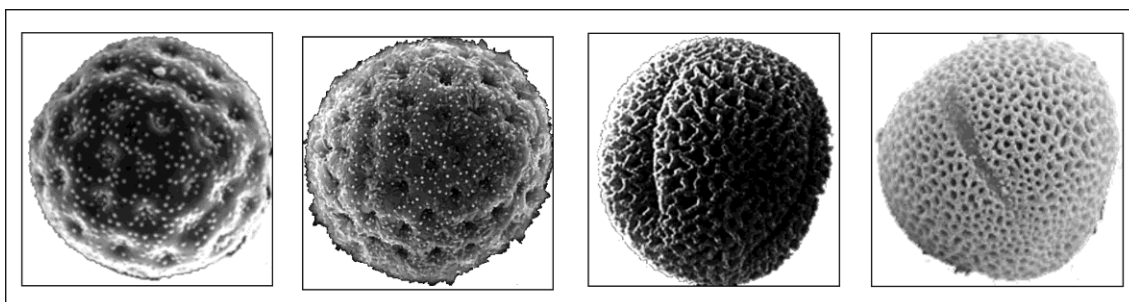


Figura 5: imagen de microscopía electrónica de los pólenes (de izquierda a derecha) de *Salsola kali*, *Chenopodium album*, *Olea europaea* y *Fraxinus excelsior*.

4.1 Clasificación de pólenes alergénicos

Una de las clasificaciones más usadas para los alérgenos del polen se basa en la distribución geográfica y las características botánicas de las plantas que lo producen. Así, tenemos tres grandes grupos que engloban a gramíneas, árboles y malezas.

4.1.1 Pólenes de gramíneas

Pertenecientes al grupo de las monocotiledóneas, las gramíneas (fam. Poaceae) son las plantas más ampliamente distribuidas geográficamente y por tanto las que mayor efecto poblacional tienen. Además, su polen es muy alergénico y abundante, alcanzando en algunos casos niveles superiores al 50% del polen total ambiental durante su época de polinización. Los alérgenos de gramíneas se pueden dividir en 12 grupos en función de su alergenicidad. Algunos de los miembros pertenecientes a este grupo son *Zea mays* (maíz), *Triticum spp* (trigo), *Oryza sativa* (arroz), *Holcus lanatus* (heno blanco), *Dactylis glomerata* (dátilo) o *Phleum pratense* (hierba timotea).

4.1.2 Pólenes de árboles

Dentro de este grupo se engloban una serie de órdenes relacionados filogenéticamente:

- Fagales (abedul, avellano, castaño y roble). Se encuentran distribuidos en el norte y centro de Europa, noroeste de África, Australia, oeste de Asia y desde Norteamérica a los Andes en Sudamérica.
- Proteales (plátano de sombra y plátano oriental). Distribuidos en todo el Hemisferio Norte en climas subtropicales y templados. Además, *Platanus*

acerifolia (plátano de sombra) es usado en parques y zonas verdes de muchas ciudades por la amplia sombra que produce.

- Scrophulariales (olivo, fresno, aligustre y lilo). El olivo tiene una amplia distribución en el área mediterránea, en América, Sudáfrica y Australia, mientras que el fresno es una fuente alérgica importante en Centro Europa debido a su uso como fuente para la obtención de madera (**Tabla 3**).
- Coniferales (ciprés y enebro). Localizados en el área mediterránea, Australia, Nueva Zelanda y Sudamérica, algunos de los alérgenos de estos árboles han sido seleccionados como marcadores específicos para el diagnóstico de la alergia a estos pólenes.

	Alérgeno	Familia de proteínas	Código de acceso
<i>Olea europaea</i>	Ole e 1 ^{56, 57}	Alérgeno del grupo 5	S75766
	Ole e 2 ⁵⁸	Profilina	Y12425
	Ole e 3 ⁵⁹	Polcalcina	AF015810
	Ole e 4 ⁶⁰	Glicosil hidrolasas	P80741
	Ole e 5 ^{60, 61}	Superóxido dismutasa (Cu/Zn)	P80740
	Ole e 6 ⁶²	Alérgeno enriquecido en cisteínas	U86342
	Ole e 7 ⁶³	nsLTP	P81430
	Ole e 8 ⁶⁴	Proteína de unión a calcio	AF078679
	Ole e 9 ⁶⁵	Glicosil hidrolasa	AF249675
	Ole e 10 ⁶⁶	Proteínas con dominios X8	AY082335
	Ole e 11 ⁶⁷	Pectín metilesterasa	GU084173
	Ole e 12	Isoflavona reductasa	EU927297
<i>Fraxinus excelsior</i>	Fra e 1 ⁶⁸	Ole e 1-like	AF526295
<i>Chenopodium album</i>	Che a 1 ⁶⁹	Ole e 1-like	Q8LGR0
	Che a 2 ⁷⁰	Profilina	Q84V37
	Che a 3 ⁷⁰	Polcalcina	AAL92871
<i>Salsola kali</i>	Sal k 1 ⁷¹	Pectín metilesterasa	ACO34813
	Sal k 2	Proteína quinasa	Q8L5K9
	Sal k 3 ⁷²	Metiltransferasa	ACO34814
	Sal k 4 ^{73, 74}	Profilina	ACS34771
	Sal k 5 ⁷⁵	Ole e 1-like	GQ427676

Tabla 3: alérgenos identificados en algunas fuentes alérgicas.

4.1.3 Pólenes de malezas

Este heterogéneo grupo engloba toda una serie de familias de plantas capaces de desarrollarse en casi todo tipo de ecosistemas, aunque muchas de ellas crecen principalmente en ambientes secos. Así, su repercusión va en aumento debido al proceso de desertización que sufre la mitad sur de Europa incrementándose el número de sensibilizaciones a sus alérgenos entre la población. Desde un punto de vista alérgico las familias más importantes son: Asteraceae (ambrosía, artemisia y

girasol); *Amaranthaceae* (quenopodio [Subfam. *Chenopodioideae*] y *salsola* [Subfam. *Salsoloideae*]) (**Tabla 3**); *Urticaceae* (*parietaria*); *Euphorbiaceae* (*mercurialis*) y *Plantaginaceae* (*plantago*).

4.2 Clasificación de alérgenos por familias de proteínas

De las 14831 familias de proteínas existentes, los alérgenos se incluyen dentro de 130 de ellas según la base de datos Pfam [76], agrupadas atendiendo a su función bioquímica y relaciones filogenéticas. Respecto a los alérgenos del polen, todos aquellos descritos y nombrados según la nomenclatura oficial de la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) [77], se pueden encontrar en Allergome [78] y se agrupan en 31 de las 130 familias mencionadas previamente (**Tabla 4**).

En este trabajo se han estudiado alérgenos pertenecientes a 8 de las familias comentadas, así como un alérgeno no incluido dentro de estos grupos:

Ole e 1-like. Se trata de proteínas glicosiladas con elevado polimorfismo y unos 19 kDa de masa molecular. Se desconoce su función bioquímica exacta pero se cree que están implicadas en los procesos de hidratación y/o germinación del polen [79]. Se encuentran específicamente expresadas en el polen y sus secuencias aminoacídicas presentan un grado de identidad mayor del 80% entre especies relacionadas filogenéticamente [80] y se ha demostrado que no existe reactividad cruzada entre ciertos miembros no relacionados filogenéticamente de esta familia de proteínas [75]. Se han descrito como marcadores de sensibilización en *O. europaea* [81] y como alérgeno principal en *F. excelsior* [82] y otros pólenes como *C. album* [69], *Syringa vulgaris* [83] o *Ligustrum vulgare* [84]. Ciertas proteínas pertenecientes a esta familia se encuentran glicosiladas, siendo capaz de estimular a los basófilos de pacientes alérgicos la fracción glicosídica purificada [85].

Profilinas. Las profilinas de plantas están formadas por secuencias de entre 131 a 134 aminoácidos y todas comparten un elevado porcentaje de residuos ácidos en su secuencia lo que les otorga un punto isoeléctrico entre 4.6 y 5.4. Se encuentran implicadas en procesos de polimerización/despolimerización del citoesqueleto de actina [86] y en determinadas vías de señalización celular como la del fosfatidilinositol. La primera profilina descrita como alérgeno fue Bet v 2 (*Betula verrucosa*) [87] y se han caracterizado como alérgenos principales en algunos pólenes como *C. album* (Che a 2)

[70] o *Phoenix dactylifera* (Pho d 2) [88]. También se han caracterizado como alérgenos algunas profilinas de frutos como las de melón (Cuc m 2) [89], naranja (Cit s 2) [90], de semillas como la soja (Gly m 3) [91] o la mostaza (Sin a 4) [92]. Su función como elemento básico modulador de la polimerización del citoesqueleto de actina es la causa del elevado grado de identidad observado en las secuencias de aminoácidos de estas proteínas en distintas fuentes alergénicas. Están por tanto implicadas en procesos de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos [93] y son responsables de la polisensibilización sufrida por muchos pacientes alérgicos.

Familia de proteínas	Familia de proteínas
Expansinas C-terminal	Grupo de proteínas de defensa de plantas
Profilinas	Isoflavona reductasas
Proteínas con motivos <i>EF-Hand</i>	Proteínas de choque térmico (Hsp70)
Dominio N-terminal de las expansinas	Proteínas de unión a quitina
Ole e 1-like	Quitinasas (Clase I)
Pectato liasas	Superóxido dismutasas (Cu/Zn)
Ribonucleasas	Pectín metilesterasas
Bet v 1-like	Ciclofilinas
Glicosil hidrolasas (familia 28)	Cistatinas
Flavoproteínas	Proteína quinasas
Taumatina-like	Enolasas
Defensinas	Plastocianina-like
Prolaminas	Proteínas con dominios WWP
Amb V-like	γ -Tioninas
Proteínas con dominios X8	Glicosil hidrolasas (familia 17)
	Proteínas inhibidoras de la invertasa

Tabla 4: familias de proteínas en las que se ha descrito algún alérgeno del polen.

Modificado de Radauer and Breiteneder [94].

Proteínas con motivos *EF-Hand*. Esta familia engloba una serie de proteínas que presentan motivos hélice-bucle-hélice caracterizados por su capacidad para unir iones Ca^{2+} . Las polcalcinas son moléculas pertenecientes a esta familia de proteínas de unos 10 kDa de masa molecular, que poseen dos motivos *EF-Hand*. Son alérgenos expresados específicamente en polen y se encuentran muy conservados entre distintas fuentes alergénicas [95], estando al igual que las profilinas, implicadas en procesos de polisensibilización. Aunque las secuencias aminoacídicas tipo *EF-Hand* son comunes en otros alérgenos no pertenecientes a la subfamilia de las polcalcinas, éstos no parecen encontrarse implicados en procesos de reactividad cruzada [96]. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que Bra r 5 (*Brassica rapa*), otra proteína con

capacidad para unir calcio, sí presenta reactividad cruzada a través de estos motivos [97].

Pectín metilesterasas (PME). Enzimas implicadas en procesos de modificación de la pared celular de plantas mediante desesterificación de la pectina liberando pectato y metanol. Su actividad enzimática se encuentra relacionada con procesos de maduración de la fruta, crecimiento y elongación de raíces y tallos o crecimiento del tubo polínico. Se han encontrado también PMEs en hongos y bacterias, así como un inhibidor de estas enzimas, por lo que se ha sugerido que tienen un papel de defensa frente a la entrada de posibles patógenos mediante disrupción de la pared celular [98]. Las PMEs se han descrito como alérgenos principales en *S. kali* (Sal k 1) [99], que es además marcador de sensibilización a esta planta, y en *O. europaea* (Ole e 11) [67]. Además, se ha descrito que el inhibidor de la PME de kiwi (Act d 6) es un alérgeno principal en este fruto.

Familias 17 y 28 de glicosil hidrolasas. Este grupo de enzimas cataliza la hidrólisis de enlaces glicosídicos entre uno o más carbohidratos o entre una fracción glicosídica y otra no glicosídica. Dentro del grupo 17 se encuentran las β -1,3-glucanasas, proteínas de masas moleculares comprendidas entre 25 y 45 kDa las cuales se han descrito como alergénicas en diversas fuentes como *O. europaea* [65], *Hevea brasiliensis* (látex) [100] o *Musa acuminata* (banana) y están implicadas en procesos de reactividad cruzada entre pólenes, alimentos y látex [101]. En la familia 28 se encuentra la subfamilia de las poligalacturonidasas (PG), enzimas con capacidad para hidrolizar enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ entre moléculas de ácido D-galacturónico. Por tanto, están implicadas en procesos que requieren de la degradación de la matriz de pectina que compone la pared de células vegetales como son la maduración de la fruta o el polen [102]. Se han descrito PGs alergénicas en pólenes de *Paspalum notatum* (Pas n 13) [103], *Platanus acerifolia* (Pla a 2) [104], *Phleum pratense* (Phl p 13) [105], *Cryptomeria japonica* (Cry j 2) [106] o *Z. mays* (Zea m 13) [107].

Prolaminas. Dentro de esta familia de proteínas se encuentran las proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTPs). Estas proteínas se pueden agrupar según su tamaño presentando masas moleculares de 7 a 9 kDa. Tienen carga neta básica y un plegamiento fundamentalmente en hélice α estabilizado por 4 puentes disulfuro en los que intervienen 8 cisteínas conservadas en esta familia de proteínas. Muestran porcentajes de identidad entre las distintas fuentes alergénicas menores del 60% y parecen estar implicadas en procesos de defensa frente a patógenos. Se han identificado

nsLTPs alergénicas en pólenes y alimentos [108-110] demostrándose que pueden estar implicadas en procesos de reactividad cruzada entre ambos grupos de fuentes alergénicas [111, 112].

Isoflavona reductasas. Este grupo de enzimas NADPH-reductasas se encuentran implicadas en la biosíntesis de los lignanos e isoflavonoides, moléculas descritas con una función en la defensa de plantas ya que tienen actividad antimicrobiana y antifúngica [113]. Algunos de los alérgenos descritos en esta familia de proteínas son Bet v 6 [114] en polen de *B. verrucosa*, Ole e 12 en *O. europaea* [115] o Pyr c 5 en el fruto de *Pyrus communis* (Peral común). Estos alérgenos también se encuentran implicados en procesos de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos [116].

Grupo 6 de Oleáceas. Este grupo de alérgenos de unos 10 kDa de masa molecular son proteínas enriquecidas en cisteínas que no pertenece a ninguna familia de proteínas conocida [62]. Se trata de moléculas con puntos isoelectrónicos ácidos alrededor de 5 y que contienen varios motivos del tipo Cys-X3-Cys-X3-Cys. La prevalencia de Ole e 6 testada en una población de 255 pacientes alérgicos al polen de *O. europaea* fue del 15%, tratándose por lo tanto de un alérgeno secundario con una sensibilización muy dependiente de la zona geográfica de procedencia de los pacientes [62].

5 Reactividad cruzada

Uno de los procesos que aumenta el repertorio de fuentes alergénicas a las que se encuentra sensibilizado un paciente y que más dificulta el diagnóstico de la alergia es la reactividad cruzada. Este fenómeno es debido a la presencia de epítomos conformacionales (discontinuos) y/o secuenciales (continuos) compartidos entre alérgenos de diversas fuentes. Esto provoca que la sensibilización frente a uno de estos alérgenos, con la consiguiente producción de IgE específica, dé lugar a una respuesta alérgica frente a otras moléculas sin la necesidad de que haya un proceso previo de sensibilización. El resultado es un incremento de la complejidad de las manifestaciones alérgicas y de la dificultad a la hora de identificar la fuente primaria de sensibilización.

Ejemplos de algunas de estas moléculas son los ya mencionados panalérgenos, moléculas con secuencias de aminoácidos altamente conservadas en distintas fuentes biológicas, como son las polcalcinas o las profilinas. Además, otras familias de proteínas alergénicas como las nsLTPs, β -1,3-glucanasas o las Ole e 1-like, también se encuentren involucradas en procesos de reactividad cruzada.

Algunos de estos alérgenos se pueden encontrar en pólenes, alimentos u otras fuentes biológicas como puede ser el látex, dando lugar a procesos de polisensibilización. Los panalérgenos son proteínas que suelen poseer funciones biológicas muy conservadas y, generalmente, presentan elevados porcentajes de identidad en sus secuencias de aminoácidos. Un punto clave de la reactividad cruzada, es que con cierta frecuencia los epítomos de las moléculas alergénicas se encuentran en regiones que tienen un papel crítico para su función biológica. Es por esto por lo que se pueden encontrar alérgenos con secuencias aminoacídicas equivalentes en fuentes muy diversas. De hecho, el diagnóstico de polisensibilización a profilina de ciertos pacientes se resuelve únicamente con la profilina Pho d 2 de *P. dactylifera*. Sin embargo, cuando se habla de inmunoterapia, es importante disponer del alérgeno que inicialmente sensibilizó al paciente, ya que sutiles diferencias en las secuencias de aminoácidos de estos alérgenos pueden dar lugar a distintas capacidades de unir IgE [95] y distintas respuestas a nivel de células T y de cambio del isotipo de anticuerpo [117, 118].

Finalmente, dependiendo de la vía de entrada de las moléculas alergénicas se producirán unos u otros síntomas. En el caso de determinados aeroalérgenos, la sensibilización se produce por vía aérea frente al polen de algunas especies, y una exposición al alérgeno, esta vez por vía digestiva, desencadena una respuesta inmune alimentaria. En la reacción alérgica asociada a alimentos los síntomas observados pueden ser dermatitis atópica, vómitos, cuadros gastrointestinales o *shock* anafiláctico y se estima en un 30% la prevalencia de esta reactividad cruzada alimentaria en pacientes con polinosis [119].

6 Aplicaciones de la proteómica y la ingeniería genética al estudio de los procesos alérgicos

6.1 Técnicas proteómicas

La proteómica es el estudio sistemático a gran escala de las proteínas en un determinado tipo celular, órgano, tejido u organismo con el fin de obtener una determinada información sobre su estructura, función, interacciones con otras proteínas, modificaciones post-traduccionales o su regulación en un sistema biológico.

Gracias a toda una serie de avances conceptuales y metodológicos, existen diversas técnicas que permiten el análisis de proteínas aisladas o mezclas complejas de proteínas.

Dependiendo de la técnica utilizada, el análisis de los datos obtenidos estará asociado a un procesamiento informático simultáneo debido al gran volumen de información que se consigue.

Existe un amplio repertorio de técnicas que se podrían englobar dentro de las denominadas técnicas proteómicas, sin embargo dos de las más empleadas son:

6.1.1 Electroforesis bidimensional (2DE)

Esta técnica es una ampliación de la tradicional PAGE-SDS en la que además de separar las proteínas de una mezcla por su masa molecular, también se separan por su punto isoeléctrico en un sistema de desarrollo en dos dimensiones.

En primer lugar, se lleva a cabo la separación de las proteínas mediante isoelectroenfoque. La mezcla de proteínas se somete a un campo eléctrico en presencia de un gradiente de pH inmovilizado, de tal manera que las proteínas migran hasta alcanzar su punto isoeléctrico, en el que adquieren una carga neta de cero y quedan inmóviles. Para favorecer el despliegue de las proteínas, exponiendo de esta manera todos los grupos susceptibles de protonarse o desprotonarse, el isoelectroenfoque se realiza en presencia de detergentes y agentes desnaturalizantes y reductores. Tras el isoelectroenfoque, la muestra se somete a un proceso de reducción y alquilación de los grupos sulfidrilo de las cisteínas para evitar que éstas vuelvan a oxidarse. Tras esta etapa se procede a la separación convencional de la mezcla de proteínas por masa molecular mediante PAGE-SDS.

Finalmente, se obtiene un gel de poliacrilamida en el que tras la tinción con azul de Coomassie o con nitrato de plata, se pueden observar una serie de manchas de aspecto circular correspondientes a las distintas proteínas separadas. Dichas manchas se pueden cortar y extraer las proteínas que contienen para posteriormente procesarlas.

6.1.2 Espectrometría de masas (MS)

Gracias a la MS podemos determinar la masa molecular y la secuencia de aminoácidos de las proteínas que existen en una muestra separándolas según su relación masa/carga.

Para el estudio de proteínas, inicialmente éstas se digieren con tripsina, aunque se pueden utilizar otras proteasas como quimotripsina o la endopeptidasa GluC. Los péptidos resultantes son ionizados mediante ionización-desorción con láser (MALDI) y separados mediante su masa/carga en un analizador de tipo cuadrupolo, trampa iónica o de tiempo de vuelo (TOF). El resultado obtenido es un espectro de masas de los fragmentos peptídicos obtenidos y denominado huella peptídica.

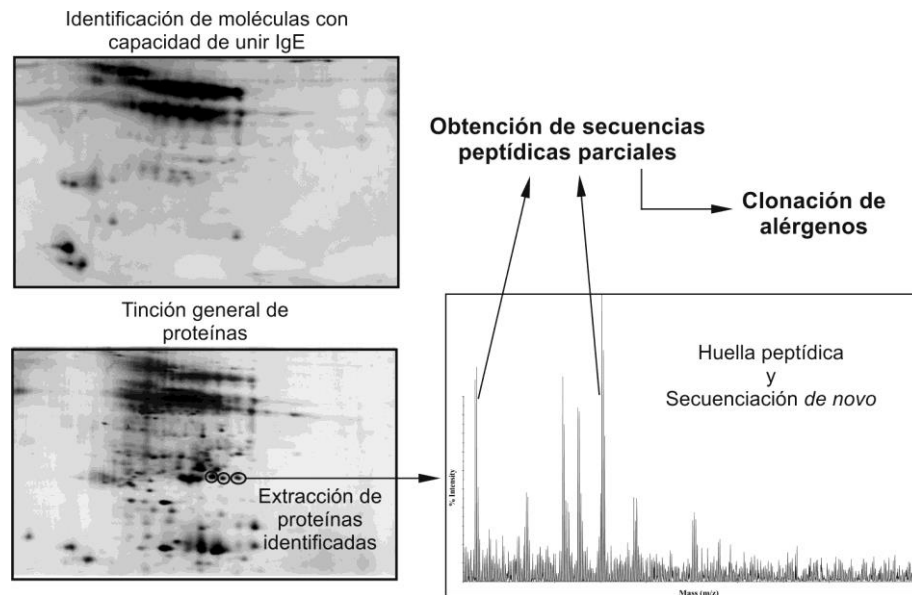


Figura 5: proceso de separación de una mezcla de proteínas. Inicialmente las proteínas se separan mediante 2DE y se obtienen secuencias peptídicas parciales mediante MS.

Posteriormente a la obtención de la huella peptídica existe la posibilidad de seleccionar los iones con mayor intensidad, fragmentarlos nuevamente mediante colisión con un gas y determinar la relación masa/carga de los fragmentos obtenidos. De esta manera se puede obtener la secuencia *de novo* de aminoácidos del fragmento peptídico inicial.

La huella peptídica, que es característica de una determinada proteína, así como la obtención de las secuencias parciales de uno o varios de los péptidos, permite identificar por similitud con secuencias de aminoácidos almacenadas en las bases de datos qué tipo de proteína se está estudiando. Además, gracias a la obtención de una potencial secuencia aminoacídica es posible diseñar posteriormente oligonucleótidos para llevar a cabo la clonación del cDNA que codifica esta proteína.

El uso de estas dos técnicas, combinado con técnicas inmunológicas, permite en el campo de la alergia la identificación y caracterización de posibles proteínas alergénicas. Por un lado la 2DE permite separar las proteínas de mezclas complejas como pueden ser

los extractos proteicos obtenidos del polen o alimentos. Posteriormente, mediante técnicas de inmunodetección es posible localizar las proteínas que tengan capacidad de unir IgE de pacientes alérgicos o IgG de anticuerpos policlonales dirigidos frente a otros alérgenos. Una vez localizadas las proteínas correspondientes a posibles alérgenos, éstas pueden ser extraídas del gel para obtener la huella peptídica o secuenciar *de novo* esa proteína y poder iniciar así el proceso de obtención de la secuencia codificante (**Figura 5**).

6.2 Técnicas de clonación y producción recombinante

La tecnología del DNA recombinante engloba toda una serie de técnicas de laboratorio que permiten la clonación de una determinada secuencia de nucleótidos [120]. Para ello se clona el cDNA en un vector plasmídico y se inserta en un sistema heterólogo, donde dicho DNA se amplifica produciéndose la síntesis de la proteína recombinante. El sistema heterólogo usado dependerá de las características de la proteína que se quiere expresar.

Concretamente, en el estudio de los procesos alérgicos, el uso de estas técnicas permite la obtención de las secuencias de nucleótidos que codifican un determinado alérgeno y su introducción en organismos capaces de producir estas moléculas como proteínas recombinantes.

La producción de alérgenos recombinantes permite:

- **La obtención de grandes cantidades del alérgeno.** Los alérgenos recombinantes solucionan los bajos rendimientos en la purificación de los homólogos naturales como consecuencia de la gran cantidad de proteínas que contienen las fuentes de las que se obtienen estos alérgenos naturales. Además, algunos de los alérgenos de interés se encuentran en muy bajas cantidades en la fuente natural.
- **La caracterización inmunológica y estructural en profundidad del alérgeno.** Esto incluye toda una serie de técnicas que permiten determinar las capacidades inmunogénicas y alergénicas de las moléculas clonadas, así como la caracterización de su estructura a distintos niveles. Se pueden realizar ensayos de reactividad cruzada entre alérgenos de distintas fuentes, identificación de epítomos o análisis poblacionales de reactividad frente al alérgeno [68, 91]

- **El estudio de una única isoforma.** Los alérgenos son moléculas que generalmente muestran un elevado polimorfismo, lo que dificulta su estudio. La disponibilidad de una única isoforma o varias permite la comparación de éstas profundizando así en qué características favorecen que una molécula tenga unas determinadas propiedades antigénicas o alergénicas. [97, 109, 121]
- **Diseño de nuevas moléculas.** Existen una amplia variedad de estrategias para la obtención de moléculas con características alergénicas y/o inmunogénicas modificadas (eliminación de epítopos B mediante delección o sustitución de residuos, moléculas híbridas, producción de dominios de un alérgeno...) ya sea para un posible uso en clínica como para el estudio de esas nuevas capacidades *in vitro*. Generalmente estas moléculas se diseñan siguiendo estrategias que persiguen una mayor efectividad de los tratamientos de AIT, así como reducir en la medida de lo posible las reacciones severas que puedan ocurrir durante la administración de la terapia. [43, 52]
- **El uso de baterías de alérgenos recombinantes para el diagnóstico clínico de la alergia.** La disponibilidad de un repertorio de alérgenos y sus isoformas permite un diagnóstico preciso del paciente con el fin de llevar a cabo estudios poblacionales y epidemiológicos y la personalización del tratamiento terapéutico del paciente alérgico. Además, el disponer de las moléculas alergénicas de diferentes fuentes biológicas ayudaría a identificar el agente sensibilizador primario [122, 123].

6.2.1 Sistemas heterólogos utilizados para la producción de alérgenos recombinantes

Actualmente, se utilizan una gran variedad de sistemas para la expresión de proteínas recombinantes, desde una bacteria como *Escherichia coli* a sistemas más complejos como pueden ser plantas e incluso animales. Cada uno de éstos tiene una serie de propiedades que le dan ventajas sobre otros.

6.2.1.1 Sistema de expresión de *E. coli*

La producción de proteínas en *E. coli* se caracteriza por la facilidad de manipulación de este microorganismo, los tiempos cortos de duplicación, así como la elevada tasa de producción de la proteína de interés. En contraposición, una de las desventajas de las

proteínas así producidas es que no tienen modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones o puentes disulfuro.

- Vectores de expresión pET: En los plásmidos pET los genes clonados se encuentran bajo el control de la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa es tan selectiva y productiva que hasta el 50% de los recursos de la bacteria se destinan a la síntesis del mRNA del gen clonado. Los plásmidos se utilizan en conjunto con células que contengan en su cromosoma la secuencia codificante para la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5, el cual es inducible mediante la adición de IPTG, un análogo de lactosa no metabolizable.

6.2.1.2 Sistema de expresión de *Pichia pastoris*

Se trata de un microorganismo eucariota unicelular inocuo, lo que hace más segura su manipulación. Los tiempos de duplicación son más largos y los medios de crecimiento e inducción más complejos que los de *E. coli*. Por otro lado, las proteínas producidas en este sistema sí tienen modificaciones post-traduccionales como por ejemplo glicosilaciones o la correcta formación de puentes disulfuro.

- Vectores de expresión pPICZ: Estos plásmidos permiten la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, encontrándose el gen a expresar bajo el control del promotor AOX1, inducible mediante la adición de metanol al medio. Contienen el gen de resistencia a zeocina para la selección de los plásmidos recombinantes tanto en *E. coli* como en *P. pastoris*. Adicionalmente, los plásmidos pPICZ α contienen la secuencia de secreción de *Saccharomyces cerevisiae* factor- α en el N-terminal de la proteína a expresar, lo que dirige la proteína al medio extracelular, facilitando su posterior purificación. Este tipo de plásmidos se integran en el cromosoma de *P. pastoris* mediante recombinación homóloga, por lo que su estabilidad es mayor.

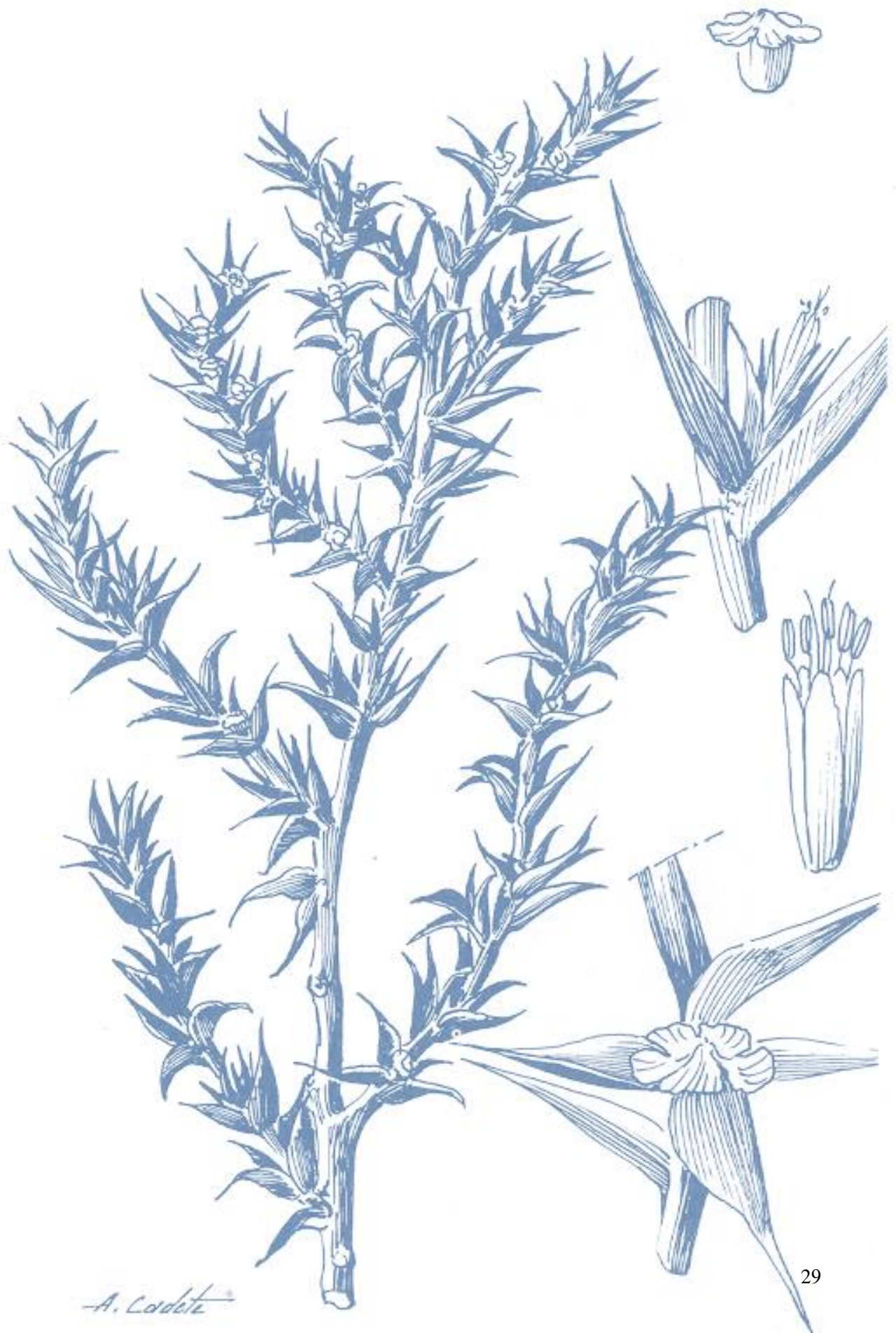
6.2.1.3 Sistema de expresión en células de insecto

En este sistema de expresión eucariota se usan baculovirus como vector para la infección de células de insecto (*Spodoptera frugiperda*) que integran en su genoma el fragmento de cDNA de la proteína que se quiere producir. Las ventajas de este sistema heterólogo son la correcta formación de puentes disulfuro, la síntesis de proteínas glicosiladas, la adición de fosforilaciones, *splicing* de intrones, un correcto plegamiento de la proteína y el procesamiento de péptidos señal. Sin embargo los medios son más

costosos, la manipulación de virus y células más compleja y los tiempos de duplicación celular más largos.

- Vectores de expresión de baculovirus. El vector que contiene el cDNA de la proteína recombinante es el baculovirus. Inicialmente, las células de insecto son co-transfectadas con un plásmido que contiene el cDNA de interés y el DNA del baculovirus, formándose nuevas partículas virales que contienen integrado en su genoma el cDNA y que infectan nuevas células. Además, durante la infección, el cDNA que codifica para la proteína recombinante comienza a expresarse ya que se encuentra bajo el control de promotores del DNA del virus, como el promotor de la polihedrina, la proteína que forma los cuerpos de oclusión en los que se incluyen los viriones.

OBJETIVOS



El objetivo principal de esta tesis ha sido profundizar en el estudio de dos fuentes de polen alergénico con interés clínico creciente, concretamente *Salsola kali* (salsola) y *Fraxinus excelsior* (fresno). Su interés se debe, en el caso de *S. kali*, al incremento de su presencia en zonas desérticas o aquellas zonas que sufren procesos de desertización, lo cual ha supuesto un incremento de su incidencia alérgica, considerándose en algunas regiones como el tercer polen más importante en cuanto a pacientes sensibilizados. En el caso de *F. excelsior* su importancia se debe al extenso uso de este árbol como fuente de madera en el centro y norte de Europa y a la reactividad cruzada que presenta con otros miembros de la familia Oleaceae como *Olea europaea*, pudiendo ser causa de la aparición de reacciones inesperadas en zonas en las que no se encuentra el fresno. La relevancia clínica de estas dos especies vegetales se debe a: i) el aumento de su distribución, ii) el incremento de los pacientes sensibilizados a salsola o fresno y iii) la reactividad cruzada que presentan con otras fuentes de pólenes o alimentos.

Para abordar su estudio se han utilizado diversas técnicas inmunológicas, proteómicas y de biología molecular combinadas con el uso de bases de datos y procesamiento *in silico*, así como de la obtención de anticuerpos específicos y sueros de pacientes alérgicos.

Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de *Salsola kali*

- Se ha observado que distintas isoformas de profilina presentes en el polen de *S. kali* presentan distintas capacidades antigénicas y alérgicas entre sí. Por ello, se llevó a cabo: i) la caracterización de dos isoformas de profilina identificadas en el polen de *S. kali*, ii) la producción recombinante y purificación de éstas y iii) el análisis de sus capacidades alérgicas y antigénicas mediante un antisuero policlonal específico y sueros de pacientes alérgicos
- El marcador de sensibilización a *S. kali* (Sal k 1) utilizado en clínica es una molécula muy polimórfica y de la cual se obtienen bajas cantidades cuando se purifica de la fuente natural. Para solventar ambas cuestiones se procedió a: i) obtener una molécula recombinante capaz de contener la mayor parte de los distintos epítomos alérgicos que componen la PME de *S. kali* y ii) llevar a cabo su validación estructural e inmunológica frente a la proteína natural.

- Estudios previos en poblaciones de pacientes alérgicos a pólenes y alérgicos a pólenes y alimentos mostraron que la prevalencia de Sal k 1 se encontraba incrementada en este último grupo. Por ello se procedió al estudio del papel de la PME de *S. kali* en posibles procesos de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos a través del uso de la proteína recombinante.
- Actualmente, existen 5 alérgenos descritos en *S. kali* (Sal k 1, Sal k 2, Sal k 3, Sal k 4 y Sal k 5). Sin embargo, mediante 2DE se pueden observar en el extracto proteico del polen de *S. kali* algunas proteínas con capacidad de unir IgE todavía no identificadas. Los objetivos fueron por lo tanto: i) la identificación mediante secuenciación *de novo* por MS en el polen de *S. kali* de una PG, proteína implicada en la degradación de la pared celular de plantas, ii) la clonación, producción recombinante y caracterización estructural e inmunológica de la PG previamente identificada y iii) obtención de un anticuerpo específico frente a la PG recombinante de *S. kali* para caracterizar e identificar su implicación en procesos de reactividad cruzada.

Bloque II. Estudio del polen de *Fraxinus excelsior* como una fuente alérgica relevante en Europa

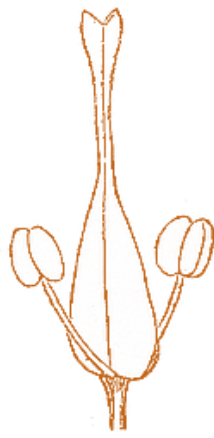
- Olivo y fresno son dos fuentes importantes de polen alérgico pertenecientes a la misma familia de vegetales y con distribuciones geográficas que incluyen toda la cuenca del Mediterráneo en el primer caso y el norte y centro de Europa en el segundo. Por tanto se pretendió llevar a cabo: i) el análisis detallado mediante técnicas inmunológicas y proteómicas del perfil alérgico del polen de fresno, con el fin de analizar la reactividad cruzada existente entre ambas fuentes a través del uso de antisueros policlonales y suero de pacientes alérgicos y ii) el estudio del grado de identidad y similitud existente entre alérgenos de olivo y fresno a través de las secuencias de nucleótidos codificantes para los posibles alérgenos encontrados en el extracto proteico del polen de *F. excelsior*.
- Dada la importancia clínica que tienen los panalérgenos como la profilina y la polcalcina como agentes inductores de alergia y su implicación en procesos de polisensibilización a pólenes y/o alimentos se llevó a cabo: i) la clonación y producción recombinante de la profilina del polen de *F. excelsior*, ii) la comparación junto con la polcalcina de *F. excelsior* de éstos con las formas naturales y iii) la

realización del estudio de los procesos de reactividad cruzada entre diversas fuentes de pólenes y alimentos alergénicos mediante el empleo de los panalérgenos profilina y polcalcina recombinantes del polen de *F. excelsior*.

MATERIALES Y MÉTODOS



Manna Ash.
Flower (mag.).



Common Ash.
Flower (mag.).



Ash.
Fruit.



Ash.
Open fruit.



Ash.
Seed and
funicle
(mag.).



Ash.
Seed cut vertically.



Olive.
(*Olea europaea*.)



Olive.
Calyx and pistil.



Olive.
Fruit cut, showing
the stone.



Olive.
Berry cut vertically
(mag.).

1 Soluciones de uso general

- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0.8% (p/v), KCl 0.02% (p/v), KH_2PO_4 0.02% (p/v) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.3% (p/v), pH 7.3.
- Tampón de lisis de minis de colonias: Tris-base 10 mM, EDTA 10 mM, NaOH 0.1 M y 1% SDS (p/v), pH 7.4.
- Tampones para la producción recombinante y purificación de la PME de *Salsola kali*:
 - Unión: fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M e imidazol 20 mM pH 8.0.
 - Elución: fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M e imidazol 0.5 M pH 8.0.
- Tampones para la producción y purificación de la PG de *S. kali*:
 - Unión: Tris-base 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, cloruro de guanidino 6 M y 2-ME 1 mM, pH 8.0.
 - Lavado: Tris-base 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM, urea 6 M y 2-ME 1 mM, pH 8.0.
 - Renaturalización: Tris-base 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 5 mM y 2-ME 1 mM, pH 8.0.
 - Elución: Tris-base 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 0.5 M y 2-ME 1 mM, pH 8.0.
- Soluciones para geles de agarosa:
 - TAE: Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.5.
 - Tampón de aplicación: glicerol 30% (v/v), azul de xilencianol 0.25% (p/v) con o sin azul de bromofenol 0.25% (p/v).
- Soluciones para PAGE-SDS:
 - Tampón de aplicación para PAGE-SDS: glicerol 10% (v/v), SDS 3% (p/v), Tris-base 1 M pH 6.8 y azul de bromofenol 0.2% (p/v).
 - Tampón de desarrollo: Tris-base 25 mM pH 8.4, glicocola 0.14% (p/v) y SDS 0.1% (p/v).
 - Azul de Coomassie: Brilliant Blue R250 al 0.25% (p/v), metanol al 45% y ácido acético glacial al 9%.
- Soluciones para 2DE:
 - Tampón de rehidratación: urea 8 M, CHAPS 2% (v/v) y DTT 0.08% (p/v).
 - Tampón de equilibrado I: urea 6 M, Tris-base 0.375 M pH 8.8, SDS 2%, DTT 2% (p/v) y glicerol 20%.
 - Tampón de equilibrado II: urea 6 M, Tris-base 0.375 M pH 8.8, SDS 2%, iodoacetamida 2.5% (p/v) y glicerol 20%.
- Soluciones para ELISA:
 - Solución de lavado: Tween-20 0.5% (v/v) en PBS.
 - Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo 3% (p/v), Tween-20 0.1% (v/v) en PBS.

- Soluciones para inmunodetección en membranas de nitrocelulosa:
 - Tampón de transferencia: Tris-base 48 mM, SDS 0.0375% (p/v), glicocola 39 mM y metanol 20% (v/v).
 - Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo 3% (p/v) y Tween-20 0.1% (v/v) en PBS.
 - Solución de lavado: Tween-20 0.1% (v/v) en PBS.

2 Enzimas comerciales

En las secuencias de corte de las enzimas de restricción se ha indicado con una flecha vertical el sitio de corte:

- T4 DNA Ligasa (Fermentas).
- Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech).
- TaKaRa *Taq* DNA polimerasa (Takara).
- *Bam*HI (Roche). G[↓]GATCC.
- *Eco*RI (Roche). G[↓]AATTC.
- *Nde*I (Roche). CA[↓]TATG.
- *Sac*I (Roche). CCGC[↓]GG
- *Sac*II (Roche). GAGCT[↓]C
- *Xho*I (Roche). C[↓]TCGAG.

3 Medios de cultivo

Todos los medios descritos a continuación se utilizaron tras su esterilización en autoclave durante 20 min a 120°C excepto aquellos en los que la esterilización por autoclave estaba contraindicada y fueron filtrados. Se añadió ampicilina (Amp) (100 ó 50 µg/ml) o kanamicina (Kan) (50 µg/ml).

Medio Ψ-Broth: utilizado para la recuperación y crecimiento celular de las bacterias *Escherichia coli* One Shot BL21(DE3) y DH5αF' tras el proceso de transformación. Contiene 20 g/l de bactotripton, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de sulfato de magnesio. El pH del medio se ajustó a 7.6 con KOH.

Medio complejo de Luria-Bertani (LB): se utilizó para el crecimiento normal de células de *E. coli*, así como para la obtención de masa bacteriana para el aislamiento de plásmidos. La expresión de las proteínas recombinantes, así como el crecimiento de los preinóculos se llevó a cabo en este medio. Se preparó añadiendo 10 g/l de bactotripton, 5 g/l de extracto de levadura y 15 g/l de NaCl. El medio se ajustó a un pH de 7.0 con HCl. Para el crecimiento de bacterias en placas de cultivo se añadieron 15 g/l de agar antes de la esterilización en autoclave. La selección de colonias transformantes se llevó a cabo añadiendo Amp o Kan a estos medios.

Medio SOC: este medio se utilizó durante el proceso de transformación de las células One Shot TOP10. Contenía 20 g/l de bacto triptona, 5 g/l de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM, pH 7.0.

TFB1: acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, RbCl 100 mM y 15% glicerol (v/v). El pH se ajustó a 5.8 con ácido acético 1 M tras lo cual se filtró para esterilizarlo con un filtro de tamaño de poro de 0.22 µm.

TFB2: MOPS 100 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM y glicerol 15% (v/v). El pH se ajustó a 6.5 con KOH 1M tras lo cual se filtró para esterilizarlo con un filtro de tamaño de poro de 0.22 µm.

4 Anticuerpos y antisueros

- Antisuero policlonal de conejo frente a la profilina de olivo y antisuero policlonal de conejo frente a nSal k 1 obtenido mediante inyecciones semanales de 100 µg de la proteína en adyuvante completo de Freud. Ambos obtenidos en el laboratorio de inmunología del Dr. Fernando Vivanco.
- Anticuerpos monoclonales de ratón frente a nSal k 1. Cedidos por ALK-Abelló.
- Antisuero policlonal de ratón frente a la PG recombinante de *S. kali* obtenido mediante inyecciones semanales de 1 µg de la proteína en adyuvante completo de Freud.
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana. Cedido por ALK-Abelló.
- Antisuero policlonal de cabra anti-IgG de conejo con peroxidasa de rábano conjugada (GAR) (Bio-Rad).
- Antisuero policlonal de cabra anti-IgG de ratón con peroxidasa de rábano conjugada (GAM) (Pierce).
- Antisuero monoclonal de ratón dirigido frente a la cola de histidinas conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich).

5 Sueros de pacientes alérgicos y controles no atópicos

5.1 Criterios de selección

Los sueros de pacientes alérgicos a miembros de la familia Amaranthaceae u Oleaceae procedían de diversas regiones de España y Francia cumpliendo los siguientes criterios: 1) rinitis estacional y/o asma en los meses comprendidos entre abril y agosto,

ambos incluidos, en el caso de *Amaranthaceae* y de abril a junio en el caso de alergia a *Oleaceae*; 2) pruebas cutáneas positivas a pólenes de *S. kali* y/o *Chenopodium album* para *Amaranthaceae*, al polen de *O. europaea* para olivo y al polen de *Fraxinus excelsior* para fresno. Además, de los alérgicos a *Amaranthaceae* se seleccionaron sueros de pacientes que tenían IgE específicas con valores de DO_{492nm} mayores de 0.1 en ELISA: a rChe a 2 en los ensayos con profilinas y a nSal k 1 para ensayos con PME. En el caso de los ensayos con PG se seleccionaron algunos sueros de alérgicos a *Amaranthaceae* por tener IgE frente a proteínas de alto peso molecular (35-45 kDa) y valores de DO_{492nm} menores de 0.1 en ELISA frente a nSal k 1.

Los pacientes de Estrasburgo alérgicos a fresno (Francia) no tenían un historial de migraciones desde o hacia zonas del Mediterráneo en las que se hubiera podido producir una sensibilización frente a alérgenos de olivo.

5.2 Procedencia de los sueros de pacientes alérgicos

Los sueros de controles no atópicos procedían de donantes anónimos con pruebas cutáneas negativas a la batería de alérgenos usados en clínica.

- Sueros de pacientes alérgicos a olivo:
 - Jaén, Hospital General. Cedidos por el Dr. Joaquín Quiralte.
- Sueros de pacientes alérgicos a *Amaranthaceae*:
 - Murcia, Hospital Virgen de la Arrixaca. Cedidos por el Dr. Javier García-Sellés.
 - Zaragoza, Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”. Cedidos por el Dr. Carlos Colás.
 - Alicante, Hospital General Universitario de Alicante. Cedidos por el Dr. Javier Fernández.
- Sueros de pacientes alérgicos a fresno:
 - Estrasburgo (Francia), L'Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Cedidos por los Drs. Gabrielle Pauli y Ashok Purohit.

6 Cepas de células químicamente competentes de *E. coli*

6.1 Aislamiento y producción de plásmidos recombinantes

One Shot TOP10 (Invitrogen) {F' ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1}: con una alta tasa de transformación con DNA superenrollado. Estas células se utilizaron para la obtención de colonias recombinantes y propagación con los diferentes fragmentos de DNA

obtenidos a lo largo del proceso de obtención del cDNA de los alérgenos que fueron clonados en el plásmido pCR2.1.

DH5 α F' (Invitrogen) {F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ -}: esta cepa se usó para propagar los plásmidos que contenían los insertos de cDNA de las distintas proteínas recombinantes y obtener así una gran cantidad de copias del mismo. Estas bacterias F' tienen el pili para la conjugación y la mutación en el gen *endA* que elimina la actividad inespecífica endonucleasa tipo 1, lo que favorece la amplificación de los plásmidos.

6.2 Producción de proteínas recombinantes

One Shot BL21(DE3) (Invitrogen) {F' *ompT* [*lon*] *hsd_B* (*r_B* *m_B*)}: estas células son compatibles con el sistema de expresión que utilizan los vectores que tienen el promotor Φ 10 del bacteriófago T7, es decir, contienen integrado en el cromosoma el lisógeno DE3 (fragmento del genoma del fago T7 que codifica para la RNA polimerasa de éste). Además son deficientes en dos proteínas clave (la proteasa Lon y la proteasa de la semimembrana externa OmpT), lo que reduce la degradación de la proteína recombinante producida.

7 Clonación del cDNA y técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

7.1 Geles de agarosa

Se pesó la agarosa estándar (Pronadisa), o la agarosa de bajo punto de fusión (Ecogen), en función del porcentaje final (p/v) que contendría el gel (1,5 y 1% para fragmentos y plásmidos, respectivamente) y se añadió al volumen necesario de TAE, llevándose la mezcla a ebullición en un microondas para su disolución mediante agitación suave. La disolución se enfrió en un molde dejándose polimerizar. La electroforesis se llevó a cabo a una diferencia de potencial constante de 100 voltios en TAE. En el caso de geles de bajo punto de fusión se realizó a 70 voltios a una temperatura de 4°C. Las muestras se trataron previamente con tampón de aplicación para DNA.

7.1.1 Tinción de geles de agarosa

Se usó para este fin bromuro de etidio (BrEt), un agente intercalante que aumenta su fluorescencia unido al DNA permitiendo localizar las bandas en las que se encuentran

los ácidos nucleicos mediante irradiación con luz ultravioleta. Los geles se sumergieron en la solución de BrEt durante 5-10 min. Los geles de agarosa de bajo punto de fusión se tiñeron durante cortos períodos de tiempo, para evitar daños irreversibles en el DNA provocados por la sobreexposición al BrEt, y mientras se recortaban las bandas, se usó una lámpara de luz ultravioleta de mayor longitud de onda (312 nm) durante el menor tiempo posible para evitar la degradación del DNA.

7.2 Vectores plasmídicos

El plásmido pCR2.1 se utilizó durante el proceso de clonación y secuenciación de los fragmentos de DNA así como del cDNA codificante. Para la expresión de los cDNAs clonados previamente en el pCR2.1 se utilizaron los plásmidos pET11b o pET41b. En ambos plásmidos el cDNA se clonó en fase con el promotor específico de la polimerasa del fago T7, que tiene una elevada actividad y se encuentra bajo el control del operador inducible *lac*. De esta forma, cuando se añade el inductor IPTG, el gen de la T7 polimerasa incluido en el cromosoma de la célula hospedadora deja de estar reprimido, activándose la síntesis de su mRNA. Tras la síntesis de la T7 polimerasa, ésta reconoce a su promotor en el plásmido y, ya que no hay represión, se inicia la transcripción del gen que contiene el plásmido.

El plásmido pET11b se utilizó para la clonación de los genes de las distintas profilinas digiriéndose previamente, con *NdeI*, *EcoRI* o *BamHI* alternativamente. El plásmido pET41b se usó para el resto de proteínas, PME y PG, clonándose cada una de ellas en fase con la cola de histidinas que el plásmido contiene en el extremo carboxilo terminal una vez digeridos con *NdeI* y *XhoI*. La selección de colonias transformantes y el mantenimiento de los cultivos en LB y LB-Agar se realizó con Amp (100 µg/ml) para células transformadas con pET11b y Kan (50 µg/ml) para células transformadas con pET41b.

7.3 Obtención del RNA total del polen y síntesis de cDNA

El mRNA total del polen de *S. kali*, *O. europaea* o *F. excelsior* se aisló siguiendo el método descrito por Ullrich y col. [124] con pequeñas modificaciones. El polen (1 g) se homogeneizó con un Polytron (Brinkmann Instruments) en Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5 con isotiocianato de guanidinio 4 M y 2-ME 140 mM. Se añadió a la mezcla el detergente N-laurilsarcosinato sódico 0.5% (p/v), se centrifugó a 2500 g durante 20 min y el sobrenadante resultante se volvió a centrifugar a 5000 g durante 10 min. Este último

sobrenadante se depositó sobre 3.1 ml de CsCl 5.7 M con EDTA 10 mM y se centrifugó a 160000 g durante 12 horas a 4°C en un rotor flotante SW-60 Ti (Beckman). Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con etanol al 70% para eliminar los restos de CsCl. La muestra se resuspendió en TE con SDS 0.1% (p/v) y se precipitó con etanol según el método descrito por Sambrook y col. El RNA obtenido se disolvió en agua estéril tratada con DEPC, su concentración se estimó espectrofotométricamente y su integridad se observó en geles desnaturalizantes en presencia de formaldehído.

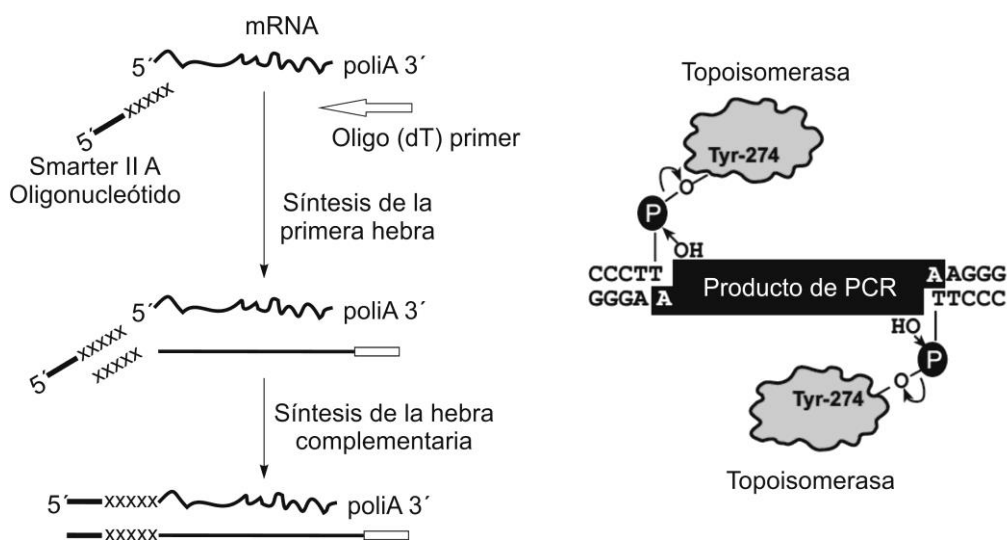


Figura 6: esquema de obtención del cDNA según el método descrito para el SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (izquierda) y de la reacción de ligación de un fragmento de DNA en el plásmido pCR2.1 (derecha).

7.4 Amplificación, clonación y secuenciación del DNA

Para la transcripción inversa del mRNA purificado en cDNA, y amplificación de éste último, se usó el SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). El mecanismo para la obtención del cDNA se basa en la síntesis inicial de una primera hebra con un oligo polidesoxitimidina modificado que aparea con la cola de poliadenosinas del mRNA. Durante los ciclos de reacción de la transcriptasa reversa, cuando ésta alcanza el final del molde de mRNA, añade una serie de residuos sin necesidad de molde. El oligonucleótido SMARTer II A hibrida con la cola del cDNA sintetizada, sirviendo así como molde para la posterior extensión del cDNA (**Figura 6**).

Para obtener fragmentos parciales de DNA o el cDNA completo se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados a partir de secuencias de DNA conocidas o de péptidos obtenidos por secuenciación *de novo* mediante MS de las distintas proteínas.

En estas reacciones de PCR se utilizó el Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech), que contiene una *Taq* DNA polimerasa deficiente en actividad exonucleasa y una pequeña cantidad de *Pfu* DNA polimerasa con actividad correctora de errores, permitiendo la obtención de un elevado número de copias y una alta fidelidad en la amplificación del DNA.

Los fragmentos obtenidos a lo largo del proceso se clonaron en el plásmido pCR2.1 para su posterior secuenciación utilizando los oligonucleótidos T7 *Forward* y T7 *Reverse*. Este plásmido se encuentra linearizado con una desoxitimidina adicional en el extremo 5' protuberante y la topoisomerasa I del virus *Vaccinia* covalentemente unida al vector. Al fragmento de DNA que se desea clonar se le aplicó un ciclo de PCR durante 10 min a 72°C en presencia de dATP y con la *Taq* DNA polimerasa (TaKaRa), enzima que carece de actividad correctora de errores y que por lo tanto añade una desoxiadenosina en los extremos 3' del DNA amplificado. De esta forma, el vector y el DNA amplificado se pueden unir a través de los extremos protuberantes que presentan. La topoisomerasa I cataliza la ligación del fragmento de DNA y posteriormente se libera del vector cuando el extremo hidroxilo 5' del producto de PCR realiza un ataque sobre el enlace fosfotirosina que une la enzima al vector, quedando así unido covalentemente el producto de PCR al plásmido (**Figura 6**).

La mezcla de reacción de 0.5-4 µl de producto de PCR, 1 µl de vector pCR2.1 y 1 µl de solución salina, ambos contenidos en el TOPO TA cloning kit (Invitrogen), se llevó a un volumen final de 6 µl y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación se añadió a las células One Shot TOP10 previamente descongeladas en hielo para su transformación. Estas células permiten usar el sistema de selección basado en el sustrato X-gal, de forma que se pueden diferenciar aquellas colonias que han sido transformadas con la construcción vector-inserto de las que sólo lo han sido con el vector. El plásmido pCR2.1 contiene un fragmento del gen de la β -galactosidasa que se complementa con el que le falta a las células One Shot TOP10. Si la construcción del plásmido es correcta el inserto inactiva este fragmento del gen de la enzima y por tanto las células no expresan β -galactosidasa activa, no hay degradación de X-gal y por tanto no hay color azul en esas colonias.

La selección de los distintos colonias para la secuenciación automática de DNA se realizó mediante preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico y en algún caso

excepcional mediante reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos de los fragmentos clonados.

7.5 Subclonación del cDNA en los vectores de expresión pET

Los fragmentos de cDNA correspondientes a las distintas proteínas, se amplificaron con la Advantage 2 Polymerase Mix utilizando como molde el cDNA clonado en el plásmido pCR2.1. En las secuencias de oligonucleótidos utilizados para esta amplificación se añadieron las secuencias de las dianas de las enzimas de restricción para la clonación en el vector de expresión. En el caso del vector pET11b se usaron las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI* o *BamHI* y para el vector pET41b *NdeI* y *XhoI*. Así, tras la obtención del cDNA mediante purificación en geles de agarosa de bajo punto de fusión, estos fragmentos y el vector de expresión pET11b o pET41b se digirieron durante 4 h a 37°C con las correspondientes enzimas de restricción. Todas las digestiones se realizaron simultáneamente excepto en el caso de la doble digestión *NdeI/EcoRI* en la que se utilizó en primer lugar *NdeI* y tras su inactivación a 65°C durante 10 min, se utilizó *EcoRI*. Seguidamente se purificaron los fragmentos de cDNA así como el vector de expresión con Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega), dejándolos libres de restos de ácidos nucleicos de la digestión y enzimas de restricción. Vector y cDNA (20 fmoles de vector a unas proporciones 1:4 y 1:2 de inserto) se incubaron conjuntamente con la ligasa de T4 (Fermentas) durante 16 h a 4°C y el producto resultante se utilizó para transformar las células DH5 α F'.

7.6 Purificación a pequeña escala del DNA plasmídico

Se realizó con GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Los cultivos de células mantenidos durante toda la noche en 4 ml de LB conteniendo Amp (100 μ g/ml) o Kan (50 μ g/ml) se sedimentaron mediante centrifugación y resuspendieron en 200 μ l de la solución de resuspensión. Se añadieron 200 μ l de solución de lisis y se incubó durante 5 min, agitando suavemente para que se clarificara la suspensión celular. Al lisado se le añadieron 350 μ l de solución de neutralización, se agitó por inversión repetidas veces la muestra y se centrifugó a 14000 g durante 10 min para separar proteínas y DNA cromosómico en el precipitado. El sobrenadante se aplicó en una columna de sílice en la cual queda adsorbido el DNA en presencia de concentraciones elevadas de sales, tras lo cual se lava con solución de lavado para eliminar contaminantes y posteriormente el plásmido se eluye con 50 μ l de agua.

7.7 Purificación de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA obtenidos tras las reacciones de PCR, digeridos con enzimas de restricción o separados por tamaño en geles de agarosa de bajo punto de fusión fueron purificados mediante Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) para eliminar restos de DNA, enzimas y agarosa.

La banda procedente del gel de agarosa de bajo punto de fusión se mezcló con 1 ml de resina y se calentó durante 5 min a 65°C. En el caso de productos de PCR o DNA procedente de la digestión con enzimas de restricción, éstos se mezclaron con 100 µl de tampón de purificación de PCR tras lo cual se añadió 1 ml de resina. En todos los casos la mezcla obtenida se hizo pasar por una columna con ayuda de una jeringa, lavándose a continuación con isopropanol al 80%. Seguidamente la columna se centrifugó a 10000 g durante 2 min para eliminar las trazas de isopropanol y finalmente, añadir 50 µl de agua para proceder a la elución del DNA mediante centrifugación de la columna.

8 Técnicas de manipulación de bacterias

8.1 Preparación de células *E. coli* químicamente competentes

Se creció un preinóculo de células DH5αF' que se encontraban congeladas a -80°C en 5 ml de Ψ-Broth a 37°C con agitación hasta una DO_{600nm} de 0.3 para inocular 100 ml del mismo medio, el cual se mantuvo en agitación y a 37°C hasta una densidad óptica de 0.48. A continuación se sedimentaron las células y se eliminó el sobrenadante. El sedimento obtenido se resuspendió en 30 ml de TFB1 previamente enfriado por cada 100 ml de cultivo, dejándose las células en hielo durante 90 min. Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las células a 4°C y el sedimento se resuspendió en 4 ml de TFB2.

8.2 Transformación de células *E. coli* One Shot TOP10

Se añadieron 2 µl del producto de la ligación a un tubo con células One Shot TOP10 previamente descongeladas y se incubó la mezcla en hielo durante 5 min. Seguidamente se llevó a cabo un choque térmico en un baño de agua a 42°C sin agitación durante 30 segundos, para inmediatamente enfriar los tubos en hielo. Se añadieron 250 µl de medio rico de crecimiento SOC a temperatura ambiente y se permitió la recuperación de las células durante 1 h a 37°C con agitación suave. Por último el volumen total en el que se encontraban las células se repartió en diferentes volúmenes que se sembraron en placas

de LB-Amp (50 µg/ml) conteniendo 40 µg/ml de X-gal en dimetilformamida añadido a la placa una hora antes.

8.3 Transformación de células *E. coli* DH5αF' y BL21(DE3)

El plásmido recombinante obtenido tras la ligación se usó para transformar las células competentes DH5αF', que carecen de la RNA polimerasa de T7 y no expresan el gen de interés y se usaron para obtener una elevada cantidad del plásmido. El plásmido purificado a partir de estas células se usó para transformar las células BL21(DE3) en las cuales se llevó a cabo la expresión de proteína recombinante.

Las células competentes congeladas a -80°C se descongelaron en hielo durante 4 min para seguidamente, adicionar todo el volumen de ligación en el caso de las DH5αF', o 10 ng del plásmido purificado en el caso de las BL21(DE3). Se incubaron en un baño de hielo durante 15 min tras lo cual se sometió a las células a un choque térmico a 42°C en baño de agua sin agitación durante 30 segundos. Se volvió a enfriar la mezcla a 4°C en hielo durante 2 min y se añadieron 0.8 ml de Ψ-Broth para la recuperación de las células, manteniéndolas a 37°C en agitación suave durante 1 h. Se repartieron a continuación 50 µl del volumen total en una placa de LB-Agar como control positivo y el volumen restante se repartió en dos placas de LB-Agar con antibiótico utilizando 1/3 y 2/3 del volumen respectivamente. Las colonias que crecieron en esta placa se sembraron en otra placa de LB-Agar con antibiótico para obtener una mayor masa celular.

8.4 Selección de transformantes

La selección de aquellas colonias que habían sido transformadas con un plásmido que contenía el inserto deseado se realizó según las diferencias de tamaño observadas en geles de agarosa. Para ello, se prepararon tubos con 40 µl de tampón de lisis, en los cuales se añadieron, tocando ligeramente con un palillo estéril, células de las diferentes colonias obtenidas. Se añadieron 3 µl de HCl 3 N y 5 µl de tampón de aplicación de geles de agarosa con azul de bromofenol. Se incubó la preparación a -80°C durante 20 min tras lo cual se centrifugó 15 min a 4°C y 14000 g. Con cuidado de no resuspender el precipitado se aplicó el sobrenadante en un gel de agarosa al 0.7%.

9 Preparación de extractos proteicos

9.1 Pólenes

Pólenes de *F. excelsior* (fresno), *Ligustrum vulgare* (aligustre), *O. europaea* (olivo), *Syringa vulgaris* (lila común), *Betula verrucosa* (abedul), *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Ambrosia trifida* (ambrosía), *Artemisia vulgaris* (artemisa), *C. album* (chenopodio), *Parietaria judaica* (parietaria), *S. kali* (salsola), *Cynodon dactylon* (grama común), *Phleum pratense* (hierba timotea), *Dactylis glomerata* (dácilo), *Eleagnus angustifolia* (árbol del paraíso), *Juniperus communis* (enebro común), *Pinus sylvestris* (pino silvestre), *Platanus acerifolia* (plátano de sombra) y *Lolium perenne* (ballica) fueron suministrados por la compañía ALK-Abelló, BioPol o Allergon. Los extractos proteicos se prepararon mediante una homogeneización por agitación suave durante 1 h para liberar las proteínas del polen al medio externo (BA 50 mM conteniendo PMSF 1 mM). La suspensión del extracto se centrifugó a 10000 g durante 20 min a 4°C, se guardó el sobrenadante y el sedimento se volvió a reconstituir en el mismo medio para agitar durante otra hora. Este ciclo se repitió 3 veces, tras lo cual se juntaron los sobrenadantes obtenidos, se midió la concentración de proteína con el método de Lowry [125], se visualizó el extracto aplicando entre 20 y 50 µg en un PAGE-SDS, se liofilizó y se conservó en alícuotas a -20°C.

9.2 Frutos secos y frutas

Se utilizaron para su preparación alimentos vegetales como *Sinapis alba* (mostaza), *Brassica napus* (colza), *Actinia deliciosa* (kiwi), *Arachis hypogea* (cacahuete), *Lycopersicum esculentum* (tomate), *Musa acuminata* (plátano), *Prunus persica* (melocotón), *Brassica oleracea* (coliflor), *Capsicum annuum* (pimiento), *Cicer arietinum* (garbanzo), *Corylus avellana* (avellana), *Cucumis melo* (melón), *Glycine max* (soja), *Juglans regia* (nuez), *Pinus pinea* (piñón), *Pyrus communis* (pera), *Pistacia vera* (pistacho), *Prunus dulcis* (almendra), *Castanea sativa* (castaña) y *Solanum tuberosum* (patata).

La preparación de estos extractos se realizó partiendo de 5 g de material liofilizado que se pulverizó en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero hasta obtener un polvo fino. Se resuspendió el resultado en 100 ml de BA 50 mM conteniendo 1 mM de PMSF tras lo cual se homogeneizó el material con potter en frío. Seguidamente se agitó mecánicamente durante 1 h a 4°C para a continuación llevar a cabo una centrifugación a

9000 g, durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se guardó y el sedimento se volvió a resuspender en 50 ml de BA 50 mM conteniendo PMSF 1 mM tras lo cual se volvió a agitar y a centrifugar, conservándose finalmente el sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más tras lo cual se juntaron los sobrenadantes y se liofilizaron. Adicionalmente, los extractos de frutos secos se resuspendieron en 100 ml de acetona en agitación suave durante 30 min tras lo cual se centrifugó a 9000 g durante 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en BA 20 mM, se centrifugó a 7000 g durante 20 min a 4°C para proceder a la cuantificación de proteína total mediante el método de Lowry y visualización del extracto por PAGE-SDS.

Para evitar la oxidación de los extractos de kiwi y pera se añadió ácido ascórbico (180 mg/ml) en el BA 50 mM, y se continuó con la extracción como se detalló previamente.

10 Producción de alérgenos recombinantes en *E. coli*

10.1 Expresión a pequeña escala. Detección de la proteína recombinante

La inducción de la expresión de la proteína correspondiente al cDNA clonado en pET11b o pET41b se llevó a cabo mediante la adición de IPTG al medio. Se utilizaron cultivos de BL21(DE3) de 5 ml de LB con antibiótico como preinóculos para cultivos de 20 ml. Cuando estos alcanzaron una densidad óptica de 1 para las profilinas ó 0.6 para el resto de proteínas, se indujo con IPTG a una concentración final de 0.4 mM para Sal k 4.02, Sal k 4.03 y Fra e 2; 0.6 mM para las PG y 1 mM para Sal k 1 manteniéndose a distintas temperaturas y tiempos de inducción.

Los niveles de expresión de la proteína recombinante se analizaron en varias colonias para seleccionar cuál era la que tenía una mayor producción de la proteína y menor presencia de productos de degradación. Se tomaron alícuotas de 1 ml de cada uno de los cultivos en estudio a diferentes tiempos así como una alícuota del cultivo previamente a la adición de IPTG. Pasado el tiempo de inducción se sedimentaron las células de las diferentes alícuotas a 4°C, 14000 g y 10 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 µl de BA 20 mM y PMSF 1 mM. El contenido celular se solubiliza mediante 3 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido y en un baño de bloque a 42°C. Por último se sedimentaron a 14000 g, 4°C y 10

min los restos insolubles de fragmentos celulares. Este sedimento se resuspendió en 500 μ l del mismo tampón.

10.2 Producción a gran escala de proteínas

Tras la selección de la colonia más eficiente en la síntesis de la proteína recombinante, se creció un preinóculo de 5 ml de LB con Amp 100 μ g/ml o Kan 50 μ g/ml durante toda la noche para un cultivo de 500 ml del mismo medio. El crecimiento celular se mantuvo a 37°C hasta una determinada densidad óptica, momento en el que se añadió IPTG, tras lo cual el cultivo se mantuvo a una temperatura controlada durante un determinado tiempo. En la **tabla 5** se muestran las condiciones a las cuales se realizó la expresión de las distintas proteínas recombinantes.

	T ^a (°C)	[IPTG] (mM)	Tiempo (horas)	DO _{600nm}	Volumen de cultivo (l)
Profilinas	37	0.4	4	1.0	0.5
PME	16	1.0	48	0.6	2
PG	16	1.0	24	0.6	1

Tabla 5: Condiciones del cultivo para la expresión de proteínas recombinantes.

Pasado el tiempo de inducción las células se sedimentaron en una centrífuga Sorvall utilizando tubos GS3 y un rotor F10 a 6000 g, 4°C durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 40 ml de BA 20 mM para las profilinas y 20 ml de tampón de unión para PME y PG a los cuales se les había añadido previamente PMSF 1 mM. A continuación se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación y se sedimentó la muestra en una centrífuga Sorvall utilizando tubos SS-34 y un rotor F21 a 12000 g, 4°C durante 10 min. El sobrenadante de la expresión de profilinas se liofilizó y el de la PME se filtró a través de filtros de 0.2 μ m de tamaño de poro. En el caso de la PG el material de partida para la purificación de la proteína es el sedimento obtenido tras los ciclos de congelación/descongelación pues la proteína de interés se encontraba insoluble en cuerpos de inclusión.

11 Aislamiento y purificación de proteínas

11.1 Profilinas recombinantes de *S. kali*, *F. excelsior* y *C. album*

11.1.1 Cromatografías de penetrabilidad Sephadex G-50 *medium* y *superfine*

Las resinas se montaron en columnas de vidrio llenando un volumen geométrico de 322 ml para el Sephadex G-50 *medium* y de 132 ml para el Sephadex G-50 *superfine*. El volumen de exclusión calculado mediante la elución de azul de dextrano fue de 250 y 33 ml respectivamente. Ambas columnas se equilibraron con BA 0.15 M y las muestras liofilizadas se reconstituyeron en el mismo tampón y se centrifugaron a 10000 g durante 10 min previamente a su aplicación en la columna para eliminar material insoluble. El flujo se mantuvo a 4 ml/min recogiendo fracciones de 4 ml para el Sephadex G-50 *medium* y a 0.5 ml/min recogiendo fracciones de 1.5 ml para el Sephadex G-50 *superfine*. El perfil cromatográfico se registró manualmente mediante medidas de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7. Para visualizar y analizar el grado de pureza de las muestras se aplicaron éstas en un PAGE-SDS al 17%.

11.1.2 Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC-RP)

El último paso de purificación de las proteínas se llevó a cabo en un sistema de HPLC con una columna Ultrapore C-18 (5 μ m x 10 mm x 25 cm) de Beckman instalada en un equipo con dos bombas peristálticas Beckman modelo 110, un elemento organizador Beckman System Gold Analog Interface Module 406, un detector ultravioleta de longitud de onda variable de doble canal modelo 168 y un inyector Vent 210 Altex externo. Todo el equipo se manipuló desde un ordenador personal. El flujo del sistema se estableció a 1.3 ml/min y las fracciones se recogieron en un colector Gilson TDC-80.

Se aplicó la muestra en H₂O/TFA 0.1% y para su elución se estableció un gradiente desde 0 a 80% de ACNo/TFA 0.1% a partir de dos disoluciones, una con H₂O/TFA 0.1% y otra con ACNo/TFA 0.1%. La elución se registró mediante medidas de absorbancia a 214 nm.

11.2 Obtención de la PME natural de *S. kali*

La purificación de nSal k 1 se realizó tal cual se describió previamente [99]. Se precipitó con sulfato amónico al 70% el extracto proteico de polen de *S. kali* obtenido a partir de 2 g de polen. Tras la centrifugación, el sedimento obtenido se resuspendió en BA 0.15 M y se dializó frente a ese mismo tampón. Se aplicó en una cromatografía de penetrabilidad Sephacryl S-100 equilibrada en BA 0.2 M, pH 8.0 el material soluble obtenido tras la diálisis y liofilización. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y liofilizaron para aplicar en una cromatografía de interacción hidrofóbica fenil sefarosa CL-4B y la elución se realizó con un gradiente discontinuo de Tris 50 mM pH 7.4 conteniendo NaCl 2M, 0.5 M y sin NaCl consecutivamente.

11.3 Obtención de la PME recombinante de *S. kali*

La fracción soluble obtenida tras los ciclos de congelación/descongelación se purificó en un sistema AKTA Purifier FPLC (GE Healthcare) con una columna HisTrap FF crude (GE Healthcare). La columna se equilibró en 10 ml de tampón de unión. Durante toda la purificación se mantuvo un flujo constante de 1 ml/min. Los 20 ml de sobrenadante con la proteína recombinante se pasaron a través de la columna, recogiendo todo el volumen no retenido. A continuación la proteína se eluyó con el tampón de elución en gradiente de 20 min, idéntico al de unión pero con 0.5 M de imidazol. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante PAGE-SDS al 15%. Todos los tampones se filtraron a través de un filtro con tamaño de poro de 0.2 µm.

11.4 Obtención de la PG recombinante de *S. kali*

La acumulación de esta proteína en cuerpos de inclusión permitió la separación de la proteína de interés del resto de proteínas solubles de *E. coli*. A continuación se describe cómo una proteína inicialmente acumulada en cuerpos de inclusión intracelulares en *E. coli* se solubiliza, se renaturaliza mediante una serie de tampones y se purifica gracias a la secuencia de histidinas que exhibe en su extremo carboxilo terminal. Este sistema de purificación se basa en el hecho de que la unión de las histidinas a un ion metálico divalente puede ocurrir en presencia de agentes caotrópicos como la urea o el cloruro de guanidinio.

El sedimento proveniente de la producción a gran escala de la PG se resuspendió en 20 ml de tampón de unión mediante agitación suave a temperatura ambiente durante una

hora. Posteriormente, se centrifugó este material a 10000 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se pasó por un filtro de tamaño de poro de 0.8 µm.

La columna HisTrap FF crude se lavó con 10 ml de agua MilliQ y se equilibró con 10 ml de tampón de unión. A continuación el sobrenadante filtrado obtenido se pasó por esta columna a un flujo de 0.5 ml/min, tras lo cual se lavó la columna con 10 ml del mismo tampón. Seguidamente se cambió el tampón de la columna al tampón de lavado con 10 ml de éste.

Para renaturalizar la proteína tras mantenerla en tampones que contenían agentes desnaturalizantes como urea o cloruro de guanidinio, se llevó a cabo un gradiente de 60 min a un flujo de 1 ml/min desde el tampón de lavado al tampón de renaturalización, dejando finalmente un lavado de 10 ml en este último tampón. La elución de la proteína se realizó con un gradiente de 20 min desde este último tampón al de elución.

Todos los tampones utilizados se pasaron a través de un filtro con tamaño de poro de 0.2 µm excepto aquellos que contenían cloruro de guanidinio o urea, que debido a su densidad, se hicieron pasar a través de filtros de 0.8 µm.

12 Caracterización molecular

12.1 Cálculo de la concentración de proteína

A lo largo del proceso de purificación y caracterización de las proteínas recombinantes se realizaron medidas para calcular la concentración de proteína. Se usaron métodos distintos en función del tipo de muestra:

12.1.1 Extractos proteicos

- Se determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry [125]. Las muestras y las preparaciones de BSA con concentraciones conocidas para la recta patrón se prepararon en un volumen final de 500 µl. A este volumen se le añadieron 2.5 ml de una disolución compuesta por NaOH 0.2 M a la cual se le añade un volumen igual de Na₂CO₃ al 4% (p/v) y, preparándolo por separado, se le añade CuSO₄ 1% (p/v) y tartrato sódico potásico 2% (p/v). Tras la adición de los 2.5 ml se agitan los tubos y se incuban durante 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 0.25 ml de reactivo de Folin, diluido a la mitad con H₂O y se agitan los tubos inmediatamente para incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 30

min. Finalmente se toman medidas de absorbancia a 750 y 500 nm. Las muestras y todos los puntos de la recta patrón se realizaron por duplicado.

12.1.2 Proteínas purificadas

- Determinación del espectro de absorción de una muestra de proteína realizando un barrido de absorbancia a 600 nm/s en un rango de longitud de onda desde 240 a 350 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7.
- Método colorimétrico del ácido bicínico (Thermo Scientific). Este sistema permite determinar la cantidad de proteína presente en la muestra gracias a que el ión cobre del primer reactivo se une a las proteínas en medio alcalino dando lugar a una coloración azul (reacción de Biuret). En esta primera reacción el cobre se reduce para interaccionar después con el ácido bicínico del segundo reactivo dando lugar a un cambio en la intensidad de absorbancia a una longitud de onda de 592 nm. La concentración de proteína se cuantifica comparando las absorbancias obtenidas con las de muestras con concentración conocida de BSA.

12.2 Espectrometría de masas y secuenciación *de novo*

Para determinar la masa molecular de las muestras purificadas, éstas se liofilizaron y enviaron a la unidad de cromatografía de gases y proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). El análisis se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker-Reflex IV (Bruker-Franzer Analytic GmbH).

Para la secuenciación *de novo*, tras la 2DE, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal y se llevaron al centro de genómica y proteómica de la UCM. Las muestras se analizaron con un espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer, con fuente de ionización tipo MALDI y dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tandem y cámara de colisión (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se introdujeron en la base de datos del NCBI para realizar una búsqueda mediante BLAST [83].

12.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

12.3.1 Preparación de los geles y desarrollo electroforético

Se llevó a cabo según el método descrito por Laemmli [126] en cubetas de electroforesis modelo Mini-Protean III (Bio-Rad). Los geles tenían un tamaño de 8 x 7.3 cm y un espesor de 0.75 ó 1 mm.

Las muestras se trataron con tampón de aplicación con o sin 2-ME y se calentaron en un baño de bloque durante 15 min a 90°C. La cubeta con los geles polimerizados se rellenó con tampón de desarrollo y se cargaron las muestras. La fuente de alimentación se programó para una intensidad de corriente de 25 mA por gel.

12.3.2 Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie

Tras la electroforesis se extrajeron los geles de sus soportes y se sumergieron en la solución de teñido durante 5-10 min. El desteñido de las zonas del gel sin proteína se llevó a cabo con un lavado rápido en agua MilliQ tras lo cual se sumergieron los geles durante 2 h en ácido acético glacial al 7.5% y metanol al 20%. Por último se conservaron en ácido acético glacial al 7.5%.

12.4 Electroforesis bidimensional (2DE)

El extracto proteico de polen liofilizado (100 µg) se reconstituyó en 120 µl de tampón de rehidratación y se añadieron 1.75 µl de TBP 200 mM. Se depositó la muestra en el recipiente suministrado por Bio-Rad, sobre el cual se colocó la tira de IPG (Bio-Rad) durante 45-60 min. Se situó el papel conductor entre el gel y los electrodos y se añadieron 1.5 ml de aceite mineral para evitar la deshidratación de la muestra. El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en un PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad), tras lo cual se incubó la tira en agitación suave durante 10 min con 1 ml de tampón de equilibrado I y II (Bio-Rad) sucesivamente. Se lavó la tira con tampón de desarrollo y se colocó en un soporte Mini-Protean III (Bio-Rad) para el desarrollo de la electroforesis en función de la masa molecular como se describió previamente pero usando geles sin concentrante.

12.4.1 Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Se fijó el gel de poliacrilamida durante 1 h en una solución de ácido acético 12%, metanol 50% y 0.5 ml/L de formaldehído al 37% previamente a la aplicación de la

solución. Se lavó 3 veces durante 20 min en etanol 50% y se realizó un pretratamiento de 1 minuto con tiosulfato sódico 0.2 g/L recién preparado. A continuación se lavó en agitación con agua MilliQ 3 veces, durante 20 segundos cada vez, para seguidamente incubarlo durante 20 min el gel con nitrato de plata 0.2% (p/v) conteniendo 0.75 ml/L de formaldehído 37%. A continuación se lavó con 2 volúmenes de agua MilliQ durante 20 segundos agitando energicamente, tras lo cual se añadió carbonato sódico 6%, 0.5 ml/L de formaldehído y 2% de la solución de tiosulfato sódico preparada previamente y se mantuvo durante un máximo de 10 min. Cuando se comienza a observar el revelado, se lava rápidamente con 2 volúmenes de agua MilliQ y se añade metanol 50% y ácido acético 12%, manteniendo en agitación el gel durante 10 min. Por último, se fija la reacción con metanol 50% durante 20 min.

12.4.2 Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie coloidal

Aquellos geles de poliacrilamida que se prepararon para analizar las proteínas separadas mediante MS se dejaron en metanol 50% y ácido fosfórico 2% durante 3 h. A continuación se lavaron 3 veces con agua MilliQ durante 10 min y se incubaron en metanol 33%, sulfato amónico 17% (p/v) y ácido fosfórico 3% durante 1 h. Tras este tiempo se añadió una disolución idéntica a la última pero a la que se le había adicionado 0.06% (p/v) de azul de Coomassie coloidal dejándolo en agitación durante toda la noche. La visualización de las proteínas tras la tinción se facilitó con lavados de agua MilliQ.

13 Caracterización espectroscópica

13.1 Espectros de absorción

Los espectros de absorción ultravioleta se realizaron durante todo el proceso de purificación en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7 en cubetas de 1 y 0.1 cm de paso óptico.

13.1.1 Cálculo del coeficiente de extinción molar

Se calculó teóricamente según el sistema propuesto por Wetlaufer [127]:

$$\epsilon_{280} = n^{\circ}\text{Tyr} \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + n^{\circ}\text{Trp} \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + n^{\circ}\text{Cys-Cys} \cdot \epsilon_{\text{Cys-Cys}};$$

siendo $\epsilon_{\text{Tyr}} = 1340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{Trp}} = 5540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{\text{Cys-Cys}} = 150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La secuencia de aminoácidos para el cálculo teórico del coeficiente de extinción molar se obtuvo de la secuenciación del cDNA. La secuencia obtenida se introdujo en el programa ProtParam [128] de la web ExPASy (<http://www.expasy.org/>).

13.2 Espectros de dicroísmo circular

Se realizaron en un dicrógrafo Jasco J-715 con una lámpara de xenón de 150 W. Se usó una cubeta circular con un paso óptico de 0.1 cm. La concentración de proteína usada fue de 200 µg/ml en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.5 y tras las medidas de dicroísmo circular se determinó la concentración de proteína con el método del BCA. El barrido de longitud de onda se realizó a una velocidad de 50 nm/min entre 250 y 320 nm.

La elipticidad a cada longitud de onda se expresó como la elipticidad molar por residuo de aminoácido en grados·cm²/dmol y se corrigió con la elipticidad molar obtenida para una disolución de tampón.

Los porcentajes correspondientes al aporte de cada una de las estructuras secundarias a los espectros de dicroísmo circular, se obtuvieron mediante la deconvolución de los espectros con el programa CDNN CD (Applied Photophysics), utilizando una matriz con 33 proteínas con contenidos en estructura secundaria conocidos.

14 Análisis estadístico

Para el análisis de los valores de los datos obtenidos en ELISA se usó el programa JMP 10, obteniendo la media, desviación estándar y *p* valor de éstos. Se realizó un estudio estadístico *t* de Student para determinar si había diferencias estadísticas entre la capacidad de unir IgE de pacientes alérgicos de las distintas proteínas. Los *p* valores menores de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

15 Homología de secuencia, alineamiento y modelado 3D

La búsqueda de secuencias similares, el alineamiento y el modelado a partir de una estructura tridimensional conocida se llevó a cabo mediante un sistema informático disponible en la página web <http://www.expasy.org/>, correspondiente al servidor de proteómica ExPASy (Expert Protein Analysis System) del SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) [129]. Los modelos obtenidos se representaron con VMD [130] y el

alineamiento de las secuencias se realizó usando el programa informático de libre acceso GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>).

16 Caracterización inmunológica

16.1 ELISA indirecto

Para la realización de estos experimentos se usaron placas de 96 pocillos de poliestireno de alta afinidad (Costar). Cada medida se realizó por duplicado y el tapizado con el antígeno se llevó a cabo a 4°C durante 16 h. Cada pocillo contenía 1 ng/μl de proteína pura o 200 ng/μl de extracto proteico en 100 μl de PBS. Tras el tapizado, se lavó la placa 4 veces con 200 μl de solución de lavado por pocillo y se añadieron 200 μl de solución de bloqueo durante 1 h. Los anticuerpos se prepararon en solución de bloqueo y cada vez que se realizó un cambio de solución en la placa se lavó 4 veces con 200 μl de solución de lavado por pocillo. Las incubaciones con la solución de bloqueo y los distintos anticuerpos se llevaron a cabo a 37°C.

16.1.1 Titulación de antisueros y anticuerpos

El suero policlonal o monoclonal a titular se diluyó partiendo de 1:100 en diluciones seriadas y se aplicó en cada pocillo 100 μl de cada una de estas diluciones y se incubó durante 1 h. A continuación, a cada pocillo se añadieron 100 μl de GAR-HRP (1:3000) o GAM-HRP (1:2500), incubándose durante 1 h y se reveló la placa. Cada vez que se cambiaron las diluciones de la placa se añadían 4 veces 200 μl de solución de lavado por pocillo. Todas las incubaciones se realizaron en estufa a 37°C.

16.1.2 Ensayos de inhibición

Se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación suave el anticuerpo o los sueros a una dilución constante establecida, frente a diluciones 1:10 del inhibidor (partiendo de 5 μg en el caso de proteína pura o 100 μg en el caso de extractos proteicos) en un volumen final de 220 μl de solución de bloqueo. Tras el bloqueo de la placa se añadieron 100 μl por pocillo de cada una de las incubaciones de inhibidor-anticuerpo durante 1 h en el caso de anticuerpos monoclonales y policlonales y 2 h en el caso de sueros. Finalmente, se añadieron 100 μl de GAR-HRP (1:3000) para antisueros policlonales o GAM-HRP (1:2500) para anticuerpos monoclonales y se procedió a revelar la placa. En el caso de los sueros, tras lavar la placa se incubó durante 1 h con

100 μ l de anti-IgE humana (1:5000) por pocillo y finalmente con GAM-HRP (1:2500) para posteriormente proceder al revelado de la placa. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C y cada vez que se cambiaban las disoluciones en la placa se realizaban 4 lavados con 200 μ l por pocillo con solución de lavado.

16.1.3 Revelado

Se llevó a cabo mediante la adición de 100 μ l por pocillo de una solución de OPD 0.63 mg/ml en citrato sódico 0.1 M, pH 5.0 conteniendo metanol 4%, a la cual previamente a su adición en la placa se le habían añadido 1.6 μ l/ml de H₂O₂ 30%. La reacción transcurrió durante un período de 10 a 30 min, tras los cuales se detuvo con 100 μ l por pocillo de ácido sulfúrico 3 N.

16.2 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana

16.2.1 Inmunodetección

Los geles cuyas proteínas se iban a transferir para una posterior inmunodetección no se tiñeron. La transferencia de proteínas a membranas de nitocelulosa (Amersham) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente [131]. Los papeles Whatman, el gel de poliacrilamida y la membrana se incubaron con el tampón de transferencia durante 5-10 min en agitación suave. A continuación se retiró el exceso de tampón y se colocaron (de abajo a arriba) 3 papeles Whatman, la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida y 3 papeles Whatman, eliminando las burbujas que pudieran quedar entre el gel y la membrana. El desarrollo de la electroforesis se realizó en un Transfer-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad), a una intensidad de corriente constante de 1 mA/cm² de gel durante 1 h.

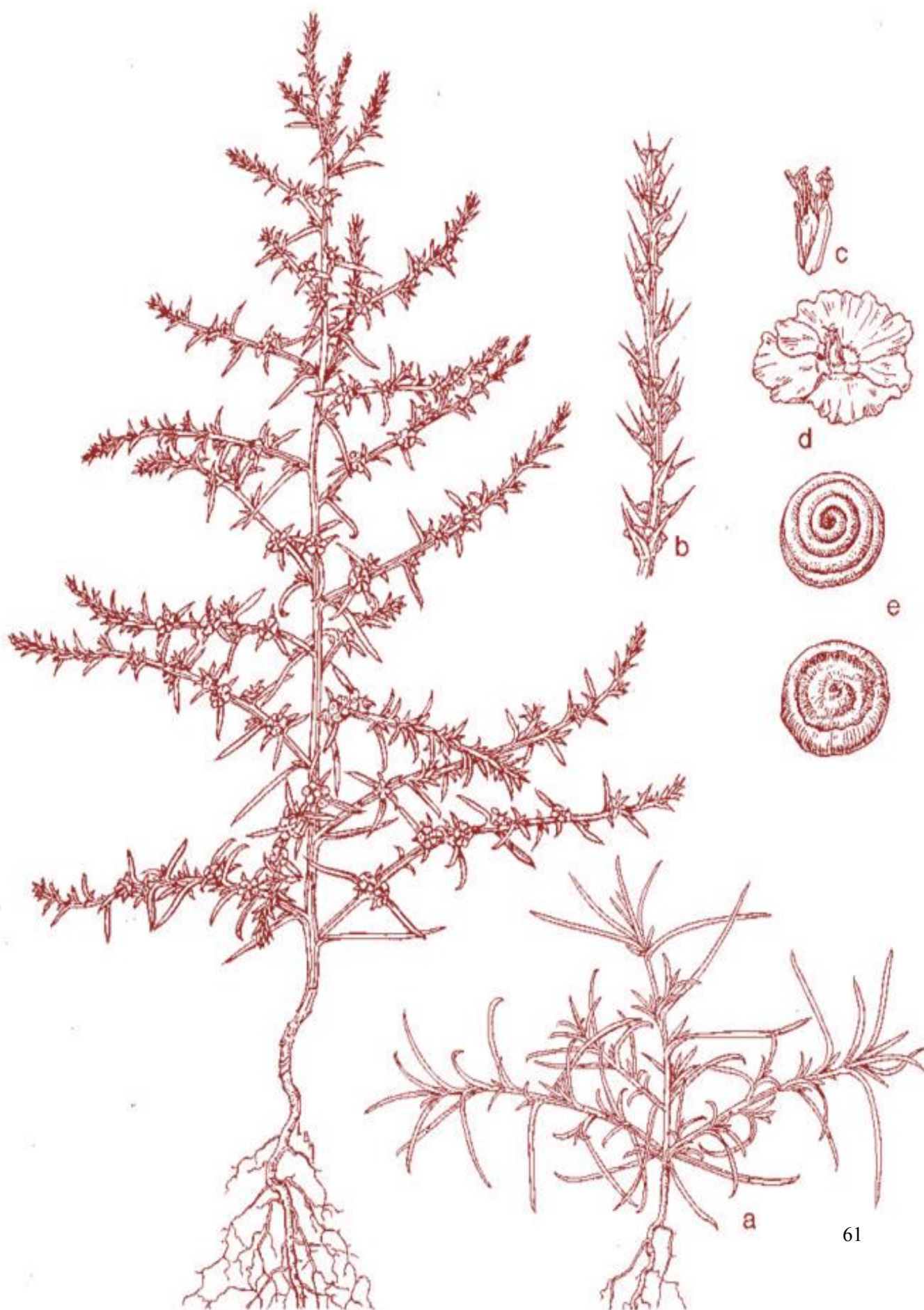
Las membranas con las proteínas transferidas se incubaron con solución de bloqueo durante 1 h. Seguidamente se incubó 1 ó 2 h respectivamente con antisuero policlonal, anticuerpo monoclonal o sueros humanos atópicos o no atópicos, tras lo cual se lavó la membrana 3 veces durante 10 min y agitación suave, con solución de lavado. A continuación se incubó la membrana durante 1 h con anti-IgE humana (1:5000), en el caso de los sueros, con GAR-HRP (1:3000) en el caso de antisueros policlonales o con GAM-HRP (1:2500) en el caso de anticuerpos monoclonales. Se lavó la membrana con 3 volúmenes de solución de lavado durante 10 min tras lo cual, en el caso de antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales, se procedió al revelado mientras que para el

suero de pacientes atópicos se incubó con GAM-HRP (1:2500) durante 1 h. Finalmente se realizaron 3 lavados de 10 min y se procedió a revelar en un LAS-3000 mini (Fujifilm) tras adición de los reactivos ECL (Amersham) para la detección.

16.2.2 Ensayos de inhibición

La inhibición se llevó a cabo incubando sueros de pacientes alérgicos individualmente o una mezcla de ellos, un anticuerpo monoclonal o un antisuero policlonal con los distintos inhibidores (1 y 5 µg) durante 2 h. Posteriormente, una vez bloqueada la membrana, se añadieron las soluciones de inhibidor-anticuerpo dejándolo en agitación durante 2 h en el caso de sueros y 1 h en el caso de anticuerpos monoclonales y policlonales. El ensayo se continuó siguiendo el protocolo como se explicó previamente para ensayos de inmunodetección.

RESULTADOS



Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de *Salsola kali*

ARTÍCULO I

The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform – molecular and immunological characterization



The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform – molecular and immunological characterization

Salvador Mas¹, Rodrigo Barderas¹, Carlos Colás², Joaquín Quiralte^{3,*}, Rosalía Rodríguez¹ and Mayte Villalba¹

¹ Universidad Complutense de Madrid, Spain

² Hospital Clínico Universitario 'Lozano Blesa', Zaragoza, Spain

³ Complejo Hospitalario de Jaén, Spain

Keywords

cross-reactivity; natural isoform; profilin; recombinant allergen; *Salsola kali* pollinosis

Correspondence

M. Villalba, Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Fax: +34 91 3944159

Tel: +34 91 3944155

E-mail: mayte@bbm1.ucm.es

*Present address

Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

(Received 12 June 2012, revised 14 September 2012, accepted 5 October 2012)

doi:10.1111/febs.12024

Chenopodiaceae pollens such as those from *Salsola kali* and *Chenopodium album* are important causes of allergy in Mediterranean areas because of the progress of desertification in European countries. Among the various allergenic protein families, profilins constitute a group of pan-allergens that are involved in polysensitization and pollen-food allergy syndrome. Two-dimensional electrophoresis analysis of *S. kali* profilin highlighted a polymorphic pattern, with several isoforms that have different molecular features (isoelectric point and molecular mass) and immunological features. Two isoforms have been cloned and sequenced. Sal k 4.02 and Sal k 4.03 displayed non-conservative amino acid changes in critical positions of the IgE epitopes. Both isoforms were produced in *Escherichia coli* and structurally and spectroscopically characterized. Changes in the electrophoretic mobility and in their IgG and IgE immunological behavior were observed in comparison with Che a 2, their counterpart from *C. album*. The IgE-binding ability of Sal k 4.03 is similar to that of Che a 2, whereas Sal k 4.02 showed a 35% reduction in IgE binding in 86% of patients, suggesting a hypoallergenic character. Three-dimensional modeling allowed us to propose which amino acid residues are involved in those immunological changes based on epitope mapping studies previously performed in other profilins. These profilin isoforms constitute suitable candidates for specific immunotherapy with recombinant allergens.

Introduction

Type I allergy is a generalized health problem in industrialized countries, affecting ~20–25% of the general population [1,2]. Among the most frequent allergies, those induced by pollens, commonly named pollinosis, are one of the most widespread [3]. In this immunological disorder, whose prevalence has significantly increased in the last years, overproduction of IgE antibodies is the starting point triggering symptoms such as rhinitis, conjunctivitis or asthma [4].

Russian thistle (*Salsola kali*) belongs to the Chenopodiaceae family and constitutes a source of allergenic pollen. The ubiquitous distribution of this plant in temperate areas such as middle eastern countries, the USA and southern Europe means that this weed has become an important allergy-inducing agent in recent years [5,6]. Moreover, the desertification process observed in some regions, its use in greening programs and the pollution derived from oil industries have increased the presence of *S. kali* in certain areas. This

weed produces large amounts of easily propagated anemophilous pollen that is responsible for a high incidence of allergy.

Specific allergenic markers, such as Sal k 1, a pectin methyl esterase considered to be the major allergen of *S. kali* pollen [7], and polysensitization markers such as profilins from various Chenopodiaceae species have been identified in the allergen profile of pollen of these species [8]. Profilins are small proteins (12–15 kDa) that are found in all eukaryotic cells. They stimulate ADP/ATP turnover in actin filament assembly, and are implicated in cellular signaling pathways through phosphatidylinositol phosphates [9]. Plant profilins have been shown to be allergens in pollen from *Chenopodium album*, *Betula verrucosa*, *Phleum pratense*, *Phoenix canariensis*, etc. [10–13], foods such as *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*, *Arachis hypogae*, etc. [14–16] or in latex from *Hevea brasiliensis* [17]. Profilins are proteins with high conserved amino acid sequences, with usually more than 75% identity between species, and they are pan-allergens due to marked IgE cross-reactivity among species [18,19]. Profilins are mainly involved in airway, latex or food sensitization cross-reactivities. Although previous studies have shown that various profilins from plant sources bind IgE from profilin-sensitized patients with similar affinity [20], the presence of particular isoforms with low IgE-binding capability in the natural sources cannot be discounted. These may be useful tools to identify the critical amino acids involved in IgE binding and to establish specific allergen epitope therapies.

Due to the low amounts of profilin in *S. kali* pollen, its recombinant production at high yields is essential for clinical and biochemical purposes. The availability of such recombinant proteins allows use of standardized diagnostic protocols in arrays of hundreds of proteins, and certain techniques may be applied to modify their allergenicity to obtain hypoallergenic variants [21–23]. In addition to classical treatments for allergy such as antihistamines or immunosuppressive drugs, immunomodulatory therapy may be performed using such modified allergens [22,24].

In the study presented here, we have cloned, sequenced and produced two profilin isoforms from *S. kali* (Sal k 4.02 and Sal k 4.03) in *Escherichia coli* in order to study their immunological and antigenic properties. The isoforms exhibited different IgE-binding capacity, and identified the amino acid changes responsible for these differences. According to the immunological data obtained, the natural pollen profilin Sal k 4.02 has reduced IgE-binding ability, suggesting its potential utilization in desensitization protocols.

Results

Identification of the profilin allergen in *S. kali* pollen extract by 2D electrophoresis

The protein content of *S. kali* pollen extract was analyzed by 2D electrophoresis after silver staining (Fig. 1A). Profilin was detected using an anti-profilin

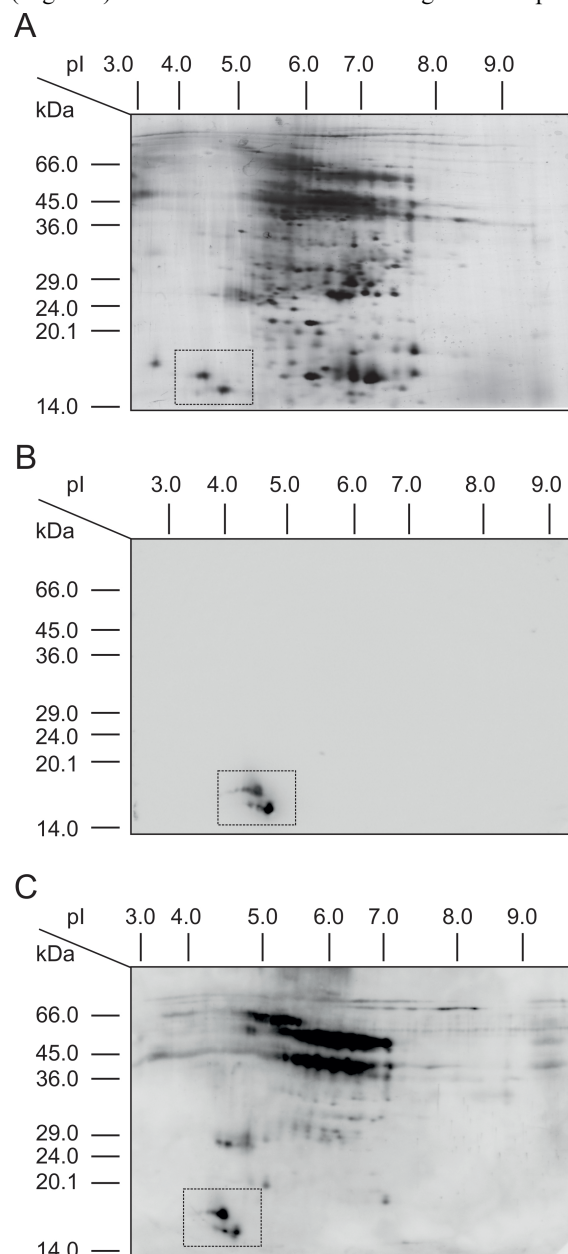


Fig. 1. Identification of profilin by 2D-PAGE analysis of *Salsola kali* pollen extract. (A) Silver staining of the pollen extract. (B) Immunostaining of *S. kali* protein extract after transfer to nitrocellulose membranes using a polyclonal antiserum specific to profilin (upper panel), or a pool of five sera from sensitized patients to Chenopodiaceae pollen (lower panel). Molecular mass markers are indicated.

polyclonal antiserum (Fig. 1B). This protein appears as a group of defined IgG-binding spots between 14.1 and 15.9 kDa and with pI values of 4.4, 4.5 and 4.7. The allergenic character of the protein was confirmed using a pool of sera from patients sensitized to profilin (Fig. 1C). The relative abundance of the isoforms and the IgG-binding profile were very similar (Fig. 1A,B). However, a different IgE-binding pattern was observed, as the two less intense spots of high molecular weight that display lower IgG recognition were better recognized by the IgE of *S. kali*-sensitized patients.

Cloning, recombinant production and purification of the *S. kali* profilin isoforms

cDNA was synthesized from *S. kali* pollen total RNA and used directly in two successive rounds of PCR to

clone *S. kali* profilin. The first round of PCR was performed using a specific primer based on the N-terminal amino acid sequence MSWQA/TYV obtained by Edman degradation of the natural protein. After sequencing the first-round PCR product, we obtained the whole cDNA sequence using specific primers based on the N- and C-terminal ends of *S. kali* profilin. We obtained two isoforms, Sal k 4.02 and Sal k 4.03 (Fig. 2A). Sal k 4.02 showed 26 amino acid changes compared with Sal k 4.03, and 33 amino acid differences compared with Che a 2 (the profilin from *C. album*), 17 of which were non-conservative changes. Eight of the non-conservative changes for Sal k 4.02 (A5, S39, N40, F68, E72, A83, C95 and T100) and Sal k 4.03 (A5, A39, N40, H68, T72, Q83, C95 and G100) were located in the IgE epitopes previously described for the homologous plant profilin Cuc m 2 [25]. We also observed that Sal k 4.03 contains two

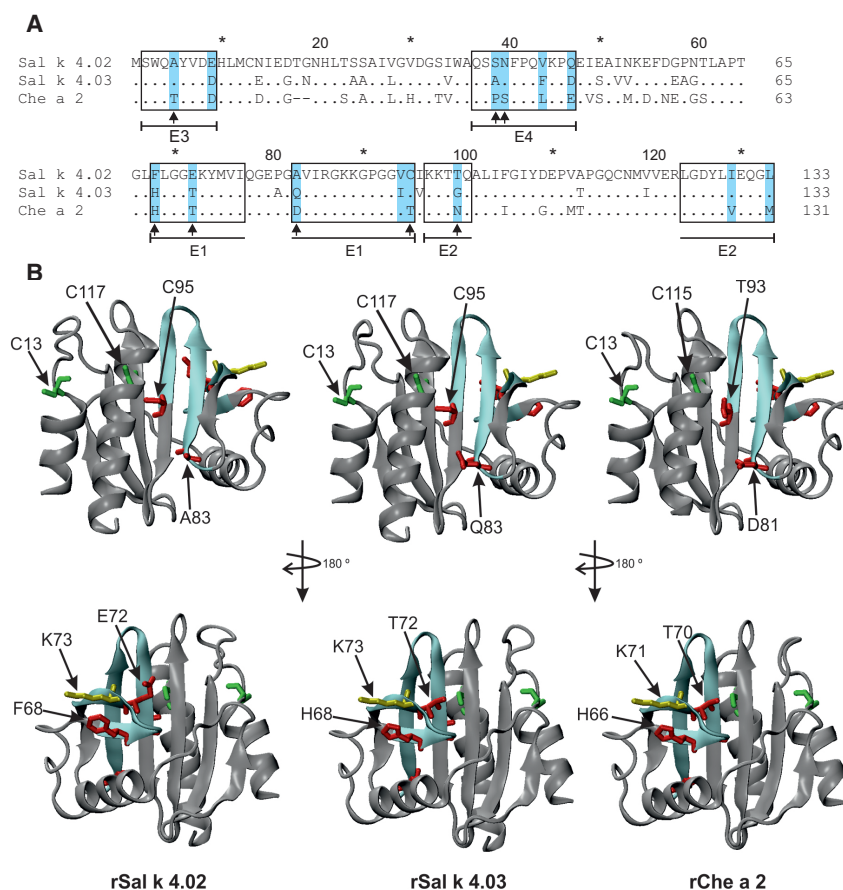


Fig. 2. Amino acid sequence alignment and 3D structure modeling of *Salsola kali* and *Chenopodium album* profilins. (A) Amino acid alignment of Sal k 4.02, Sal k 4.03 and Che a 2. The four epitopes (E1–E4) identified in Cuc m 2 profilin [25] are boxed, and the amino acid differences are highlighted in blue. Arrows indicate non-conserved amino acid changes inside the epitopes; dots indicates the same amino acid as rSal k 4.02; hyphens indicate gaps. (B) 3D modeling of Sal k 4.02, Sal k 4.03 and Che a 2. The E1 epitope is shown in pale blue, the non-conservative amino acid changes are indicated in red, and the conserved K73/71 amino acids are indicated in yellow. Cysteine residues located outside the E1 epitope are shown in green.

non-conservative changes inside the epitope E1 with respect to Che a 2 (H68 and T72). Furthermore, profilin isoforms from *S. kali* possess a third cysteine residue at position 95 compared to Che a 2, which contains threonine at this position (Fig. 2B).

We expressed both isoforms in *E. coli* to determine whether the eight non-conservative changes in Sal k 4.02 at the E1, E2, E3 and E4 epitopes were responsible for decreased IgE-binding capacity. The highest level of recombinant proteins was observed after 4 h of induction with 0.4 mM isopropyl thio- β -D-galactoside (Fig. 3A). Recombinant proteins were observed in the soluble fraction after cell disruption, and were detected using a specific polyclonal antiserum against profilin (Fig. 3B). Supernatant containing profilin was lyophilized, and subjected to size-exclusion chromatography followed by reversed-phase HPLC (Fig. 3C).

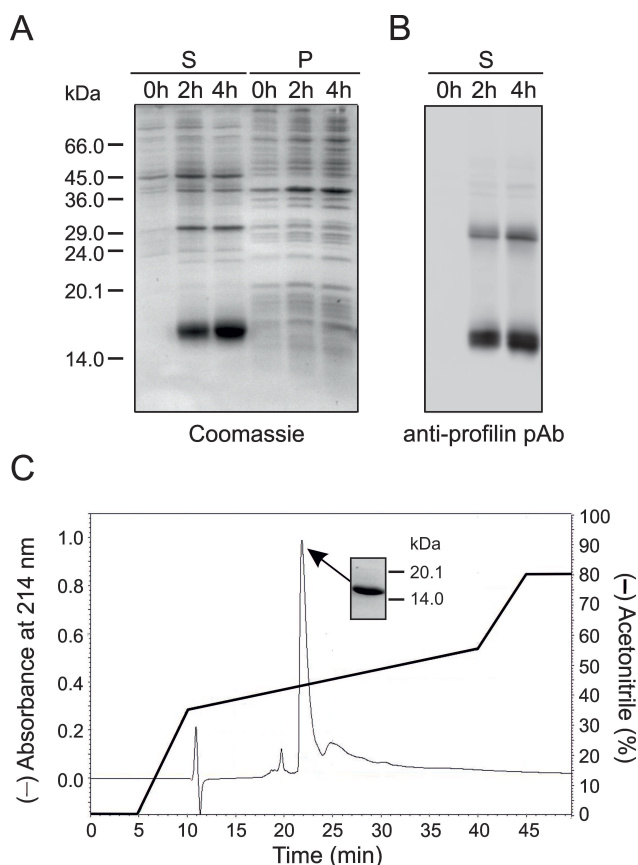


Fig. 3. Recombinant production of *Salsola kali* profilins. (A) SDS/PAGE analysis of the time course of rSal k 4.02 expression. S, soluble fraction; P, pellet. The same expression profile was obtained for rSal k 4.02 and rSal k 4.03. (B) Time-course expression of rSal k 4 in the soluble fraction was also analyzed by immunostaining with profilin-specific polyclonal antiserum after SDS/PAGE. (C) Reversed-phase HPLC purification profile of the recombinant profilins and SDS/PAGE analysis of the fractions collected (inset). Molecular mass markers are indicated.

Molecular characterization of rSal k 4 isoforms

Molecular characterization of rSal k 4.02 and rSal k 4.03 was performed in comparison with rChe a 2. Molecular mass was determined by mass spectrometry. The experimental values for the MS of rSal k 4.02 and rChe a 2 are 138.4 and 123.7 Da lower, respectively, than the theoretically estimated masses derived from the cDNA sequences of the clones (14 340.3 and 14 099.1 Da, respectively) (Fig. 4A), suggesting that these two proteins have lost their initial methionine by translational processing. However, bacterial processing of the N-terminus of rSal k 4.03 had not taken place as the theoretical mass was 14 268.2 Da and a value of 14 213.7 Da was obtained experimentally by MS (Fig. 4A). The amino acid compositions obtained by acid hydrolysis of the three recombinant proteins agree with those derived from the DNA sequences.

Secondary structure analyses were performed by far-UV CD. Similar spectra and percentages of secondary structure elements were obtained for rSal k 4.02, rSal k 4.03 and rChe a 2 (Fig. 4B) as deduced by deconvolution of the spectra (Fig. 4C), and corresponded to the parameters obtained for the 3D structure of the profilin from *Arabidopsis thaliana* [26]. These data indicate that the recombinant proteins rSal k 4.02 and rSal k 4.03 are properly folded.

The electrophoretic mobility of the three profilins was assayed in the presence or absence of 2-mercaptoethanol (Fig. 4D). The mobility of rChe a 2, unlike that of rSal k 4.02 and rSal k 4.03, was significantly affected under reducing conditions. This effect was probably due to the potential formation of a disulfide bond in *S. kali* profilins between cysteines 95 and 117 instead of the disulfide bond observed in Che a 2 between cysteines 13 and 117. Disruption of this disulfide bond in *S. kali* profilins after reduction does not induce a significant conformational change, and therefore the electrophoretic mobility is not affected.

Immunological characterization: rSal k 4.02 possess low IgE-binding ability

An ELISA was used to evaluate the IgE-binding ability of rSal k 4.02 and rSal k 4.03, and to establish the prevalence of these allergens in a population of 165 patients with Chenopodiaceae pollinosis. The prevalence of rChe a 2 and rSal k 4.03 was 29%, and that of rSal k 4.02 was 24%. Moreover, 86% of the sera that showed positive IgE-binding values for the three profilins showed higher reactivity against rSal k 4.03 and rChe a 2 than to rSal k 4.02 (Fig. 5A). The same sera showed significant differences in IgE-binding

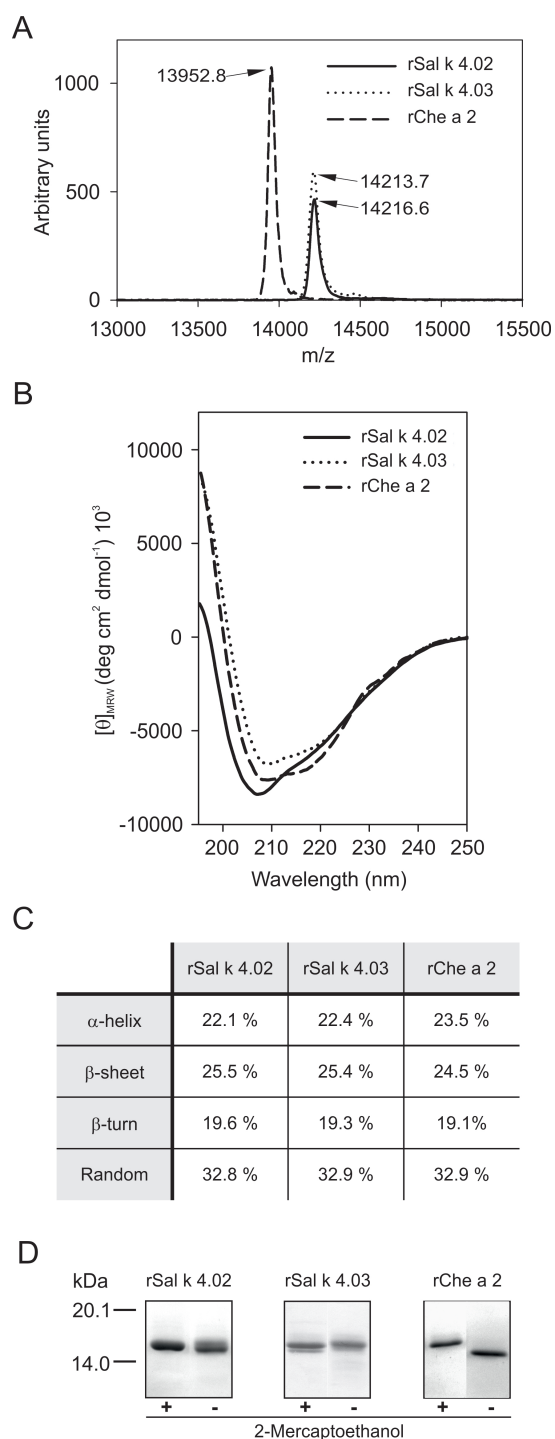


Fig. 4. Molecular characterization of rSal k 4.02 and rSal k 4.03 in comparison with rChe a 2. (A) MS analysis of purified recombinant proteins. m/z , mass/charge ratio. (B) CD spectra in the far-UV range (195–250 nm). $[\theta]_{MRW}$, mean residue weight ellipticity. (C) Deconvolution values determined from CD spectra of each protein. (D) Analysis of the mobility of rChe a 2, rSal k 4.02 and rSal k 4.03 proteins in the absence (–) or presence (+) of 2-mercaptoethanol by SDS/PAGE and Coomassie Blue staining. Molecular mass markers are indicated.

capacity when comparing rSal k 4.02 with rSal k 4.03 and rSal k 4.02 with rChe a 2, the median reduction of rSal k 4.02 IgE-binding capacity being $\sim 35\%$ ($P < 0.05$), but not when comparing rSal k 4.03 with rChe a 2 ($P = 0.72$) (Fig. 5B).

We tested five randomly collected sera by immunoblotting against rChe a 2, rSal k 4.02 and rSal k 4.03 under reducing conditions (Fig. 5C). Similar differences in the IgE recognition pattern were observed for both ELISA and immunoblotting. These data suggest that rSal k 4.02 is not able to bind IgE antibodies as well as rSal k 4.03 and rChe a 2.

Profilin-specific polyclonal antiserum allowed us to evaluate the antigenic character of these allergens in comparison with rChe a 2. In contrast to the decreased IgE-binding observed for rSal k 4.02, inhibition assays performed with anti-profilin polyclonal antiserum against the three allergens showed a similar IgG-binding behavior (Fig. 6A). An inhibition assay performed with a pool of eight human sera showed a sharp decrease in the inhibition capacity of rSal k 4.02 compared with rSal k 4.03 and rChe a 2 (Fig. 6B). The IgE-binding inhibition of rSal k 4.03 by rSal k 4.02 required 35 times as much inhibitor to reach the IC_{50} inhibition. Moreover, to achieve the same inhibition to rChe a 2, nine- and 100-fold increases in the inhibitors rSal k 4.03 and rSal k 4.02 over Che a 2 were required, respectively. rChe a 2 and rSal k 4.03 were able to totally inhibit IgE binding to rSal k 4.02. However, inhibition reached similar values with all profilins used as inhibitors when their concentration was ten times higher than the antigen in the wells and IgE binding was saturated with the inhibitors.

Thus these results indicate that rSal k 4.02 is a natural hypoallergenic profilin isoform in comparison to rSal k 4.03 and rChe a 2, whose IgE-binding behavior was almost equivalent.

Discussion

The production of hypoallergenic derivatives from modified cDNA encoding allergens is an important strategy that is currently used to obtain new molecules with improved qualities for use as diagnostic and/or therapeutic tools in clinical trials. Successful allergen-specific immunotherapy is associated with an increase in blocking IgG antibodies [27]. Many approaches have been used to obtain allergenic variants with decreased IgE-binding capacity that are able to induce an IgG-associated response. Several strategies involve disrupting the 3D structure and thus the conformational B-cell epitopes but maintaining the T-cell epitopes, such as deletion variants [28], fragments and

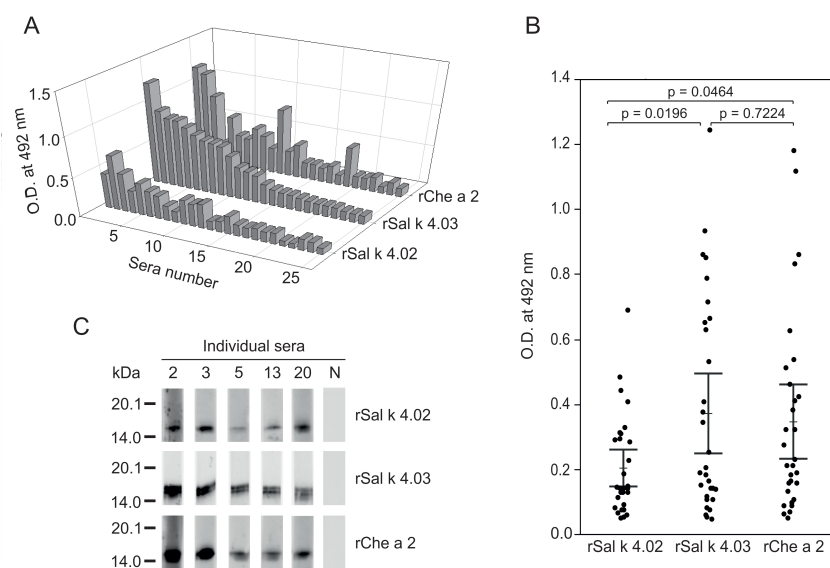


Fig. 5. Analysis of the IgE binding to rSal k 4.02, rSal k 4.03 and rChe a 2. (A) Specific IgE levels for each allergen in absorbance units for 25 representative individual sera in ELISA. (B) Median value and standard deviation of all sera tested in the assay. *P* values for all comparisons were calculated. (C) Analysis of IgE binding to nitrocellulose-blotted samples after SDS/PAGE using sera from five allergic patients and a non-atopic control (lane N). Molecular mass markers are indicated.

allergen-tandem derivatives [29–32], mutants and hybrid molecules [22]. Others are based on producing allergens in which the IgE-binding residues have been changed while preserving the correct folding of the molecule [33–35]. Such strategies have had various levels of success, but in all cases artificial molecules such as chimeras or non-natural isoforms have been used. The potential advantages of natural hypoallergenic molecules over genetically modified ones are that they are more likely to achieve a 3D fold identical to that of the sensitizing allergen. Thus, the availability of recombinant isoforms of an allergen with equivalent antigenic but lower allergenic properties may enable identification of the features that make an allergen a molecule able to stimulate the immune system, in addition to its clinical potential.

The widespread distribution of *S. kali* in arid regions and countries suffering from desertification means that this weed is an important source of allergenic pollen. Recently, an increase in sensitization to this plant has been observed in several regions of Spain, with Sal k 1 being the only major allergen identified and a marker for primary sensitization to this pollen [7].

The growing number of patients who are polysensitized to various pollens has emphasized the importance of pan-allergens. Many reports have focused on these ubiquitous allergens because they are responsible for a high number of polysensitization diagnoses, even though these individuals may be sensitized to a single allergen family [18,19,36]. Profilins are proteins that

have been identified in all analyzed eukaryotic cells and show a highly conserved amino acid sequence, explaining their frequent involvement in IgE polysensitization. Indeed, profilins have been implicated in cross-reactivity between pollens and fruits and in the latex fruit syndrome [18,19,37–39]. The amount of the natural protein in many biological sources such as Chenopodiaceae pollen is quite low. As previously described, 30 µg of pure profilin may be obtained per gram of dried Chenopod pollen [10]. In addition, this low amount of protein is often present in several isoforms with different allergenic features. To solve this yield problem, heterologous expression systems may be used to obtain reasonable amounts of recombinant protein. High-scale production may improve structural and immunological characterization, but limits study to few or just one isoform of the allergen instead of the multiple isoforms that frequently occur in the natural source. The availability of recombinant allergens in diagnosis and treatment of allergic disease encourages the production of modified genetically engineered allergens.

The allergens Sal k 4.02 and Sal k 4.03 described here were produced in *E. coli* and isolated using several chromatographic steps. Purity of the final products was achieved by MS, reversed-phase HPLC and SDS/PAGE. The molecular characterization and analysis of their amino acid sequences showed typical properties of profilins, such as an acidic isoelectric point close to 4.5, a molecular mass of ~ 14 kDa, and

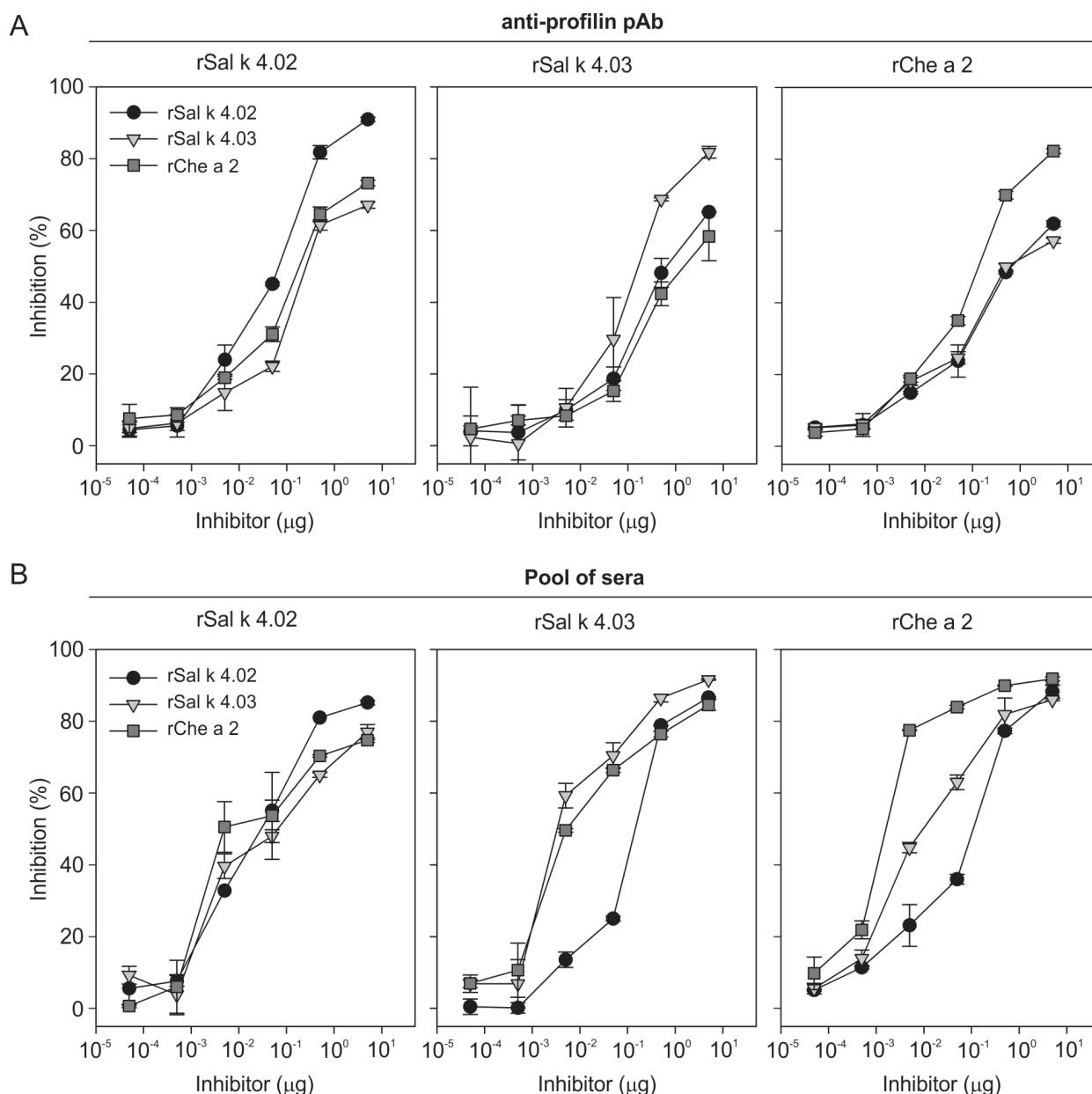


Fig. 6. ELISA inhibition test with rSal k 4.02, rSal k 4.03 and rChe a 2. (A) Polyclonal antibody-binding inhibition to rSal k 4.02, rSal k 4.03 and rChe a 2-coated wells using the same allergens as inhibitors. (B) ELISA inhibition assay of a pool of sera from eight random sensitized patients to rSal k 4.02, rSal k 4.03 and rChe a 2-coated wells, using the same allergens as inhibitors.

a secondary structure content similar to other members of the family. The recombinant profilins obtained from *S. kali* pollen showed a notable degree of amino acid sequence identity with other identified profilins. To compare the immunological features of *S. kali* profilin isoforms, rChe a 2 profilin from the botanically related plant *C. album* was used as reference [8], as rChe a 2 had been previously validated against the natural allergen isolated from *C. album* pollen [10]. After immunological characterization, we determined

that the various isoforms of Sal k 4 show various IgE-binding capabilities, and suggests a hypoallergenic nature for rSal k 4.02 in comparison to rSal k 4.03 and rChe a 2 because it binds significantly lower levels of IgE. Although the possibility cannot be discarded that this response is due to a lower IgE cross-reactivity of Sal k 4.02 to other primary sensitizing profilins in other pollens of the environment, it should be taken into account that *S. kali* pollen is a main source of sensitization for the Zaragoza patient population [40],

and thus *S. kali* profilin is a primary sensitization source. In the province of Jaén, *S. kali* co-exists with olive tree cultivars, the main agriculture crop, and is an important source of allergenic pollen.

The assayed profilins from *S. kali* and *C. album* show a high amino acid sequence identity (73% between rSal k 4.02 and rChe a 2, 75% between rSal k 4.03 and rChe a 2 and 80% between rSal k 4.02 and rSal k 4.03) and similarity (87%, 90% and 87%, respectively). Interestingly, the previously reported profilin from *S. kali*, Sal k 4.01 [41] shows higher identity and similarity to rChe a 2 (78% and 91%, respectively) than rSal k 4.02 or rSal k 4.03 do, probably as a consequence of using degenerate primers derived from comparisons with other plant profilins, and highlighting the polymorphic character of *S. kali* profilin. These data support the different allergenic character of rSal k 4.02, with the immunological behavior of rSal k 4.01 being more similar to rChe a 2 [41].

The three profilins studied here share common IgG and IgE epitopes because almost all the positive patients recognizing rChe a 2 are also positive for *S. kali* profilins, and near complete inhibition of the IgE-binding signal to rSal k 4.02 and rSal k 4.03 is obtained when rChe a 2 is used as inhibitor. However, as deduced from inhibition assays using a pool of sera, 35- and 100-fold increases in rSal k 4.02 were required to inhibit IgE binding to rSal k 4.03 and rChe a 2, respectively. On the other hand, only a ninefold increase in rSal k 4.03, which shares some of the amino acid changes with rChe a 2 (F68→H66 and E72→T70) and contains C95 in the E1 epitope as for rSal k 4.02, was required to inhibit IgE binding to rChe a 2. Due to the high similarity between these profilins (even higher in the epitopic regions), and assuming that the secondary structure of rSal k 4.02 obtained by CD analysis is that expected for a well-folded state in this protein family, the decreased immunological features are associated with several amino acid replacements in the IgE epitope sequences. Thus, the affinity changes produced by a few key amino acid replacements are the main cause of alterations in the immunological response. These alterations are mitigated at very high concentration of inhibitors that lead to complete inhibition.

Thirty-three and 29 amino acid changes were observed between Che a 2 and Sal k 4.02 and between Che a 2 and rSal k 4.03 respectively, 17 of which were non-conservative, of which eight were located within the epitopes (comparing Che a 2 with Sal k 4.02). The E1, E2, E3 and E4 epitopes show four, one, one and two non-conservative changes, respectively (Fig. 2A). However, all the changes present in the E2, E3 and E4 epitopes and the A at position 83 of the E1 epitope in

Sal k 4.02 are present in other allergenic profilins such as those from *Olea europaea*, *Betula pendula* or *Zea mays* [42], and thus are unlikely to be the cause of the reduced allergenicity. However, the E1 epitope binds IgE mainly through electrostatic interactions [43,44] and shows two changes in charge in Sal k 4.02 (F68→H66 and E72→T70) that are adjacent to K73 in Sal k 4 and K71 in Che a 2, which is an amino acid highly conserved in most allergenic profilins. Furthermore, the E1 epitope shows one additional non-conservative amino acid change (C95→T93) that may result in formation of a disulfide bond with C117, resulting in a more compact structure in the surrounding region. These changes may be enough to avoid IgE binding to rSal k 4.02 throughout the E1 epitope, thus resulting in a natural variant with reduced IgE-binding capacity in comparison to rChe a 2. Thus, the results obtained here indicate that some amino acid positions may be critical for IgE binding but not IgG binding.

Although to date there are no immunotherapeutic approaches based on profilin alone and its potential use requires further study, we suggest that, based on the results presented here, the isoform Sal k 4.02 may be a good candidate for inclusion in desensitization protocols using cocktails of recombinant allergens.

Experimental procedures

Protein extracts

Pollen from *S. kali* and *C. album* were obtained from ALK-Abelló (Madrid, Spain). Pollen protein extracts were obtained by saline extraction as described previously [45]. The protein extract concentration was determined as described by Lowry *et al.* [46].

Cloning strategy

cDNA from *S. kali* pollen was synthesized from total RNA using a SMART RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences/Clontech, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions, and used directly as a template for PCR cloning. Amplification of *S. kali* profilin was performed in two successive rounds of PCR. The sense oligonucleotide was designed based on the N-terminus amino acid sequence MSWQA/TYV, obtained by Edman degradation of the natural protein, including the *Nde*I restriction site (underlined): 5'-atacatATGTCNTGGCARRCNTAYGT-3'. A PCR reaction was performed using this oligonucleotide and the universal primer mix contained in the SMART RACE cDNA amplification kit to obtain the *S. kali* profilin cDNA sequence. Then, the antisense oligonucleotide 5'-cgctgaggatccTTAGAGGCCCTGTTCAACGAG-3', containing a *Bam*HI restriction site (underlined),

was designed based on the sequence corresponding to the C-terminus end (LVEQGL) of *S. kali* profilin obtained from the first round of PCR. PCR products were cloned into pCR2.1 plasmid (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), and the DNA from several clones was sequenced. The pCR2.1/Sal k 4 constructs were digested with *Nde*I and *Bam*HI restriction enzymes, and cDNA encoding the Sal k 4 isoforms was sub-cloned into the pET 11b (Novagen, Billerica, MA, USA) expression vector digested using the same restriction enzymes. This construct was used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells to express Sal k 4.02 and Sal k 4.03 as non-fusion recombinant proteins.

Expression and purification of rSal k 4.02 and rSal k 4.03

Overnight BL21 (DE3) cultures containing the recombinant constructs were grown in LB medium containing 0.1 mg/ml ampicillin to an attenuation at 600 nm of 1.0. Induction of these cultures was performed by the addition of 0.4 mM isopropyl thio- β -D-galactoside, and they were maintained for 4 h at 37 °C. Then the cultures were centrifuged at 6000 *g* for 20 min at 4 °C. The pellet was reconstituted in 20 mM ammonium bicarbonate, pH 8.0, containing 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. After bacterial lysis by three cycles of freezing and thawing at 42 °C, the material was centrifuged at 12 000 *g* and the soluble fraction was lyophilized. The recombinant protein was isolated as described for rChe a 2 [10], and purified in three chromatographic steps: size-exclusion chromatography using a Sephadex G-50 medium column (39 \times 5.75 cm) equilibrated in 0.2 M ammonium bicarbonate, pH 8.0, size-exclusion chromatography in a Sephadex G-50 superfine column (42 \times 2 cm) equilibrated in the same buffer, and finally reversed-phase HPLC in a Nucleosil C18 column with an 0–80% acetonitrile gradient in 0.1% trifluoroacetic acid.

Sera and antibodies

The Ethical Committee of the Complutense University (Madrid, Spain) approved the protocols used for experimental work with mice and all the methodology related to the use of human sera in the study.

Sera were obtained from patients fulfilling the following criteria: (a) seasonal rhinitis and/or asthma from April to August during at least two consecutive years, (b) positive prick test for *S. kali* and/or *C. album* pollens, and (c) IgE values by ELISA against Che a 2 higher than 0.1 units of absorbance at 492 nm for all sera. Sera were obtained from 165 patients recruited from Zaragoza (Spain), where *S. kali* pollen is a main source of sensitization, and from Jaén (Spain), where *S. kali* pollen is a significant allergenic pollen. Written informed consent was obtained from all patients.

Rabbit polyclonal antiserum against the olive pollen profilin (Ole e 2) was obtained by weekly injections of the

protein (100 μ g) in complete Freund's adjuvant. The use of animals for experimental procedures was supervised by the animal facility of the Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain) to ensure that the experiments were performed in accordance with legislation and the guidelines of Ethical Committee of the Fundación Jiménez Díaz and Complutense University. Horseradish peroxidase-labeled goat polyclonal Ig against rabbit IgG was obtained from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Mouse monoclonal Ig against human IgE was kindly donated by ALK-Abelló. Horseradish peroxidase-labeled goat polyclonal Ig against mouse IgG was purchased from Pierce Chemical Co (Rockford, IL, USA).

Edman degradation, MS analysis and CD

Edman degradation of the protein was performed using a 477A sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). MS of purified proteins was performed in a Bruker Reflex IV MALDI-TOF apparatus (Bruker-Franzer Analytic, Bremen, Germany). The CD spectrum was recorded in the far-UV range on a JASCO J-715 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan) at 200 μ g mL⁻¹ protein concentration in 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, at room temperature. CDNN CD spectra deconvolution software (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) was used to deconvolute the CD spectra recorded.

Analytical procedures

Amino acid analysis of pure recombinant proteins was performed using a Biochrom 30 amino acid analyzer instrument (Biochrom, Cambridge, UK) after hydrolysis with 6 N HCl. SDS/PAGE was performed in 17% polyacrylamide gels. Proteins were stained with Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Molecular mass determinations were performed using protein markers MW-SDS-70L (Sigma-Aldrich). 2D electrophoresis was performed in a PROTEAN IEF cell (Bio-Rad) using 7 cm long, pH 3–10, linear ReadyStrip IPG strips (Bio-Rad) under reducing conditions in the presence of tributylphosphine, dithiothreitol and iodoacetamide, followed by 17% SDS/PAGE. Proteins were visualized after silver staining.

The concentration of recombinant profilins was calculated by measuring the absorbance at 280 nm in a DU-7 spectrometer (Beckman, Barcelona, Spain) using the same extinction coefficient ($\epsilon^{0.1\%}$) of 1.1 for the three proteins.

Immunological characterization

Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) after SDS/PAGE under reducing (with 5% 2-mercaptoethanol) and non-reducing conditions or after 2D electrophoresis under reducing conditions. Membranes were incubated with individual

human sera (diluted 1 : 10), mouse monoclonal Ig against human IgE (diluted 1 : 5000) and horseradish peroxidase-labeled goat Ig against mouse IgG (diluted 1 : 2500), or alternatively rabbit polyclonal antiserum raised against Ole e 2 (diluted 1 : 10 000) followed by horseradish peroxidase-labeled goat Ig against rabbit IgG (diluted 1 : 3000). For immunoblotting inhibition assays, a pool of sera ($n = 5$) (diluted 1:10) was pre-incubated with NaCl/P_i, and 1 or 5 µg of rSal k 4.02, rSal k 4.03 or rChe a 2 as inhibitors. Chemiluminescent signal was detected using ECL western blotting reagent (Amersham Biosciences).

Indirect ELISA was performed in 96-well plates coated with 0.1 µg purified recombinant protein or 20 µg pollen extract. Assays were detected using individual human serum, a pool of human sera ($n = 5$) (diluted 1 : 10) or anti-Ole e 2 polyclonal antiserum (diluted 1 : 10 000), previously adsorbed to various concentrations of inhibitors ranging from 1 ng to 10 µg. Binding of human IgE was detected by mouse monoclonal Ig against human IgE (diluted 1 : 5000) followed by horseradish peroxidase-labeled goat Ig against mouse IgG (diluted 1 : 2500), and binding of polyclonal antiserum against Ole e 2 was detected by horseradish peroxidase-labeled goat Ig against rabbit IgG (diluted 1 : 3000). The signal was measured at 492 nm in an iMark microplate absorbance reader (Bio-Rad). In ELISA assays, absorbance values above 0.1 were taken as positive, and the percentage inhibition was calculated according to the formula: inhibition (%) = $[1 - (\text{absorbance at 492 nm with inhibitor} / \text{absorbance at 492 nm without inhibitor})] \times 100$.

Statistical analysis, modeling and alignment

For analysis of ELISA datasets, we used JMP 10 (SAS Business Analytics) to calculate the mean, standard deviation and P values. A two-tailed Student's t -test was performed assuming unequal variances to assess whether the groups were statistically different from each other. All P values were derived from a two-tailed statistical test. P values < 0.05 were considered statistically significant. 3D structure modeling of the allergens was performed using SWISS-MODEL, the fully automated protein structure homology-modeling server of the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://swissmodel.expasy.org/>) [47]. The template used for modeling Sal k 4.02, Sal k 4.03 and Che a 2 was the profilin from *Arabidopsis thaliana* (Protein Data Bank ID [3NUL](#)) using to the comparative automated mode. The model obtained was represented using VMD [48]. Alignment of sequences was performed using GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>).

Acknowledgements

R.B. is a fellow of the Ramón y Cajal program of the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain). This work was supported by grants SAF2008-04053

from the Ministerio de Ciencia e Innovación, SAF2011-26716 from the Ministerio de Economía y Competitividad, and RD07/0064/0009 from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

References

- 1 Eder W, Ege MJ & von Mutius E (2006) The asthma epidemic. *N Engl J Med* **355**, 2226–2235.
- 2 Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK & Williams H (2006) Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* **368**, 733–743.
- 3 Sibbald B (1993) Epidemiology of allergic rhinitis. *Monogr Allergy* **31**, 61–79.
- 4 Dahl R, Andersen PS, Chivato T, Valovirta E & de Monchy J (2004) National prevalence of respiratory allergic disorders. *Respir Med* **98**, 398–403.
- 5 Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quirarte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G *et al.* (2008) Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* **63**, 1550–1558.
- 6 Colás C, Monzón S, Venturini M & Lezaun A (2006) Double-blind, placebo-controlled study with a modified therapeutic vaccine of Salsola kali (Russian thistle) administered through use of a cluster schedule. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 810–816.
- 7 Barderas R, García-Selles J, Salamanca G, Colás C, Barber D, Rodríguez R & Villalba M (2007) A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (Salsola kali) pollen. *Clin Exp Allergy* **37**, 1111–1119.
- 8 Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E & Rodríguez R (2004) Profilin (Che a 2) and polcalcine (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 1192–1198.
- 9 Jockusch BM, Murk K & Rothkegel M (2007) The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **159**, 131–149.
- 10 Barderas R, Villalba M & Rodríguez R (2004) Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization. *Biol Chem* **385**, 731–737.
- 11 Postigo I, Guisantes JA, Negro JM, Rodríguez-Pacheco R, David-García D & Martínez J (2009) Identification of 2 new allergens of *Phoenix dactylifera* using an immunoproteomics approach. *J Investig Allergol Clin Immunol* **19**, 504–507.

- 12 Valenta R, Duchêne M, Pettenburger K, Sillaber C, Valent P, Bettelheim P, Breitenbach M, Rumpold H, Kraft D & Scheiner O (1991) Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* **253**, 557–560.
- 13 Valenta R, Ball T, Vrtala S, Duchêne M, Kraft D & Scheiner O (1994) cDNA cloning and expression of timothy grass (*Phleum pratense*) pollen profilin in *Escherichia coli*: comparison with birch pollen profilin. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 106–118.
- 14 López-Torrejón G, Crespo JF, Sánchez-Monge R, Sánchez-Jiménez M, Alvarez J, Rodríguez J & Salcedo G (2005) Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clin Exp Allergy* **35**, 1065–1072.
- 15 Cases B, Pastor-Vargas C, Dones FG, Perez-Gordo M, Maroto AS, de las Heras M, Vivanco F & Cuesta-Herranz J (2010) Watermelon profilin: characterization of a major allergen as a model for plant-derived food profilins. *Int Arch Allergy Immunol* **153**, 215–222.
- 16 Cabanos C, Tandang-Silvas MR, Odijk V, Brostedt P, Tanaka A, Utsumi S & Maruyama N (2010) Expression, purification, cross-reactivity and homology modeling of peanut profilin. *Protein Expr Purif* **73**, 36–45.
- 17 Vallier P, Balland S, Harf R, Valenta R & Deviller P (1995) Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*: clinical implications. *Clin Exp Allergy* **25**, 332–339.
- 18 Weber RW (2003) Patterns of pollen cross-allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* **112**, 229–239. quiz 240.
- 19 Santos A & Van Ree R (2011) Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int Arch Allergy Immunol* **155**, 191–204.
- 20 Sirvent S, Tordesillas L, Villalba M, Díaz-Perales A, Cuesta-Herranz J, Salcedo G & Rodríguez R (2011) Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity. *Ann Allergy Asthma Immunol* **106**, 429–435.
- 21 Ferreira F, Wallner M, Breiteneder H, Hartl A, Thalhamer J & Ebner C (2002) Genetic engineering of allergens: future therapeutic products. *Int Arch Allergy Immunol* **128**, 171–178.
- 22 Marazuela EG, Rodríguez R, Barber D, Villalba M & Batanero E (2007) Hypoallergenic mutants of Ole e 1, the major olive pollen allergen, as candidates for allergy vaccines. *Clin Exp Allergy* **37**, 251–260.
- 23 Saarne T, Kaiser L, Grönlund H, Rasool O, Gafvelin G & van Hage-Hamsten M (2005) Rational design of hypoallergens applied to the major cat allergen Fel d 1. *Clin Exp Allergy* **35**, 657–663.
- 24 Reisinger J, Horak F, Pauli G, van Hage M, Cromwell O, König F, Valenta R & Niederberger V (2005) Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 347–354.
- 25 Tordesillas L, Pacios LF, Palacín A, Cuesta-Herranz J, Madero M & Díaz-Perales A (2010) Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clin Exp Allergy* **40**, 174–181.
- 26 Thorn KS, Christensen HE, Shigeta R, Huddler D, Shalaby L, Lindberg U, Chua NH & Schutt CE (1997) The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure* **5**, 19–32.
- 27 Akdis M & Akdis CA (2009) Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 645–660.
- 28 García-Ortega L, Lacadena J, Villalba M, Rodríguez R, Crespo JF, Rodríguez J, Pascual C, Olmo N, Onaderra M, del Pozo AM *et al.* (2005) Production and characterization of a noncytotoxic deletion variant of the *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f1 displaying reduced IgE binding. *FEBS J* **272**, 2536–2544.
- 29 van Hage-Hamsten M, Kronqvist M, Zetterström O, Johansson E, Niederberger V, Vrtala S, Grönlund H, Grönneberg R & Valenta R (1999) Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1: results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season. *J Allergy Clin Immunol* **104**, 969–977.
- 30 Mahler V, Vrtala S, Kuss O, Diepgen TL, Suck R, Cromwell O, Fiebig H, Hartl A, Thalhamer J, Schuler G *et al.* (2004) Vaccines for birch pollen allergy based on genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *Clin Exp Allergy* **34**, 115–122.
- 31 Linhart B, Mothes-Luksch N, Vrtala S, Kneidinger M, Valent P & Valenta R (2008) A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, Phl p 2 and Phl p 6. *Biol Chem* **389**, 925–933.
- 32 Campana R, Vrtala S, Maderegger B, Jertschin P, Stegellner G, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Blatt K, Gieras A, Zafred D *et al.* (2010) Hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1 obtained by rational sequence reassembly. *J Allergy Clin Immunol* **126**, 1024–1031. 1031 e1021–1028.
- 33 Walgraffe D, Mattéotti C, El Bakkoury M, Garcia L, Marchand C, Bullens D, Vandenbranden M & Jacquet A (2009) A hypoallergenic variant of Der p 1 as a candidate for mite allergy vaccines. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 1150–1156.
- 34 Rouvinen J, Jänis J, Laukkanen ML, Jylhä S, Niemi M, Päivinen T, Mäkinen-Kiljunen S, Haahtela T, Söderlund H & Takkinen K (2010) Transient dimers of allergens. *PLoS ONE* **5**, e9037.

- 35 Ball T, Linhart B, Sonneck K, Blatt K, Herrmann H, Valent P, Stoecklinger A, Lupinek C, Thalhammer J, Fedorov AA *et al.* (2009) Reducing allergenicity by altering allergen fold: a mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy* **64**, 569–580.
- 36 Ledesma A, Barderas R, Westritschnig K, Quiralte J, Pascual CY, Valenta R, Villalba M & Rodríguez R (2006) A comparative analysis of the cross-reactivity in the polcalcin family including Syr v 3, a new member from lilac pollen. *Allergy* **61**, 477–484.
- 37 Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, Ferreira F, Tejkl M, Edelmann H, Kraft D *et al.* (1992) Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J Exp Med* **175**, 377–385.
- 38 Daschner A, Crespo JF & Pascual CY (1998) Specific IgE to recombinant vegetal panallergen (rBet v 2) and fruit allergy in pollinic patients. *Allergy* **53**, 614–618.
- 39 Wagner S & Breiteneder H (2002) The latex-fruit syndrome. *Biochem Soc Trans* **30**, 935–940.
- 40 Ferrer L, Carnés J, Rojas-Hijazo B, Lopez-Matas MA, Sobrevía MT & Colás C (2012) Assessing degree of flowering implicates multiple Chenopodiaceae/ Amaranthaceae species in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* **158**, 54–62.
- 41 Assarehzadegan MA, Amini A, Sankian M, Tehrani M, Jabbari F & Varasteh A (2010) Sal k 4, a new allergen of *Salsola kali*, is profilin: a predictive value of conserved conformational regions in cross-reactivity with other plant-derived profilins. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 1441–1446.
- 42 Jimenez-Lopez JC, Morales S, Castro AJ, Volkmann D, Rodríguez-García MI & Alché JdeD (2012) Characterization of profilin polymorphism in pollen with a focus on multifunctionality. *PLoS One* **7**, e30878.
- 43 López-Torrejón G, Díaz-Perales A, Rodríguez J, Sánchez-Monge R, Crespo JF, Salcedo G & Pacios LF (2007) An experimental and modeling-based approach to locate IgE epitopes of plant profilin allergens. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 1481–1488.
- 44 Sinha N, Mohan S, Lipschultz CA & Smith-Gill SJ (2002) Differences in electrostatic properties at antibody-antigen binding sites: implications for specificity and cross-reactivity. *Biophys J* **83**, 2946–2968.
- 45 Barderas R, Villalba M, Lombardero M & Rodríguez R (2002) Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* **127**, 47–54.
- 46 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- 47 Arnold K, Bordoli L, Kopp J & Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201.
- 48 Humphrey W, Dalke A & Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33–38, 27–38.

Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de *Salsola kali*

ARTÍCULO II

A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic pollen Sal k 1 for *Salsola kali* allergy diagnosis



A recombinant Sal k 1 isoform as an alternative to the polymorphic pollen Sal k 1 for *Salsola kali* allergy diagnosis

Salvador Mas^a, Patrice Boissy^b, Rafael I. Monsalve^b, Javier Cuesta-Herranz^c, Araceli Díaz-Perales^d, Carlos Colás^e, Rosalía Rodríguez^a, Mayte Villalba^a, Rodrigo Barderas^a

^aDpto. Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

^bALK-Abelló, Madrid, Spain

^cHospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^dCentro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

^eHospital Clínico Universitario 'Lozano Blesa', Zaragoza, Spain

Short title: Recombinant production of *S. kali* sensitization marker

Keywords: Sal k 1, *Salsola kali* pollinosis, Amaranthaceae, Recombinant allergen, Cross-reactivity, Pectin methylesterase

Corresponding author:

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense
28040 Madrid, Spain
Fax: +34 91 3944159
Tel: +34 91 3944155
E-mail:

Acknowledgements:

We thank the excellent technical support of Sara Abián. This work was supported by grants SAF2008-04053 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, SAF2011-26716 from the Ministerio de Economía y Competitividad and RIRAAF Network RD12/0013/0015 from the ISCIII. R.B. is a fellow of the Ramón y Cajal program of the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

Summary

Background Amaranthaceae pollens are main causes of allergy in desert countries. Their incidence has been increasing in the last years due to the desertification process occurring in many countries. In some regions of Spain, *Salsola kali* is the main cause of pollinosis at the same level than olive and grass pollen. Sal k 1 is the sensitization marker of *S. kali* pollinosis. It is actually used in clinical diagnosis to this weed, but is purified at a low yield from *S. kali* pollen.

Objective To produce a recombinant variant of Sal k 1 able to span the structural and immunological properties of the natural isoforms present in *S. kali* pollen and validate its potential use for the diagnosis of *S. kali* pollen sensitized patients.

Methods Sal k 1-encoding cDNA was amplified by PCR, cloned in pET41b vector and used to transform BL21(DE3) *E. coli* cells to overproduce the recombinant allergen. Immunoblotting, ELISA, histamine release and skin prick test were used to validate the recombinant protein with the natural form isolated from pollen. Sera and blood cells from *S. kali* pollen sensitized patients and anti-Sal k 1 monoclonal and polyclonal antisera were used.

Results rSal k 1 has been produced in *E. coli* with a final yield of 7.5 mg/L of cell culture. The expressed protein was isolated, purified to homogeneity, structurally characterized by circular dichroism and immunologically validated against the natural form isolated from pollen by ELISA, immunostaining and histamine release. Natural Sal k 1 was validated as a useful diagnostic tool by skin prick test. In addition, Sal k 1 exhibited a higher degree of IgE cross-reactivity with plant-derived food extracts such as peanut, almond or tomato than with related and non-related pollen sources such as *P. acerifolia* and Oleaceae members.

Conclusion Sal k 1, the sensitization marker of *S. kali* pollen has been expressed as a recombinant protein in *E. coli*. rSal k 1 maintains its structural and immunological properties intact in comparison to nSal k 1, while spans the immunological properties of most of the natural isoforms found in pollen. rSal k 1 might substitute in clinical diagnosis the natural form isolated from pollen, and in the future could be used in a safer and more specific immunotherapy of *S. kali* patients.

Introduction

A wide repertory of plant families produces relevant allergenic pollens [1, 2]. Pollens from the Amaranthaceae family are gaining relevance as allergenic inducer in countries where the climate change is causing extensive desertification because these resistant weeds are able to rapidly colonize these areas [3]. The most relevant members of this family in the Mediterranean area are *Salsola kali* and *Chenopodium album* [4, 5].

Despite the allergenic cross-reactivity observed between these members of the Amaranthaceae family [6], about 10 to 30% of the patients are sensitized mainly to *S. kali* [7]. Several allergens from *C. album* (Che a 1 [8], Che a 2 and Che a 3 [9]) and *S. kali* (Sal k 1 [7], Sal k 2 (accession number: [Q8L5K9](#)), Sal k 3 [10], Sal k 4 [11, 12], and Sal k 5 [13]) pollens have been identified so far. Sal k 1 is the allergenic marker of *S. kali* pollen able to discriminate between sensitized and non-sensitized patients to this weed [7]. An average prevalence of Sal k 1, a pectin methylesterase (PME), in certain areas of Spain is about 18% among all pollen-sensitized patients, and about 70% in *S. kali* pollen sensitized patients, as revealed by the multi-centre study (“VEGETALIA” and “EXPO”) [14]. The same cohort of patients showed a prevalence of 2% to the major allergen of *C. album* (Che a 1) in all pollen sensitized patients [14], and thus confirming the role of Ole e 1-like family as sensitization marker of the Amaranthaceae species.

In addition to Sal k 1, another PME from olive (*Olea europaea*) pollen -Ole e 11- and from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and kiwi fruit (*Actinia deliciosa*) have also been reported as allergens [15-18]. Sal k 1 shares an amino acid sequence identity of 57, 17 and 23% with olive pollen, tomato and kiwi PMEs, respectively. Despite this low identity observed between PMEs from pollens and plant-derived foods, these proteins possess a highly conserved catalytic core very specialized and conserved during evolution, containing Ala153, Gln173, Asp174, Asp195, and Arg253 residues in the catalytic site of Sal k 1. This conserved region might enable PME cross-reactivity processes from different sources since a significant IgG cross-reactivity could be observed when comparing PMEs from olive pollen and other plant-derived food sources such as avocado, pear or tomato.

Sal k 1 purified from pollen is already being used in commercial diagnostic protocols to determine the

specific IgE levels of patients to the sensitization marker of *S. kali* by ImmunoCAP (Thermo Fisher Scientific). However, Sal k 1 is purified from pollen at a very low yield and with a high number of isoforms. Only 100 µg of homogeneous protein can be obtained from 5 g of dried pollen [7]. Then, the availability of one well characterized recombinant isoform equivalent to those natural isoforms present in *S. kali* pollen extract should be a useful tool to standardize diagnostic and immunotherapeutic protocols, what should circumvent batch to batch variability and allergenic protein content concentration problems that are observed in *S. kali* natural protein extracts used in these protocols [19, 20].

In this context, the aim of this work consisted of the production of a recombinant isoform of Sal k 1 able to span the structural and immunological properties of the natural isoforms present in *S. kali* pollen, and then, validating its use for the diagnosis of allergy to *S. kali*. Moreover, we have also found that the PME could be implicated in pollen-pollen and plant-derived food-pollen cross-reactivity processes.

Materials and methods

Protein extracts

Pollen from several plant species was obtained from ALK-Abelló (Madrid, Spain). Pollen protein extracts were prepared by saline extraction as described previously [8]. Plant-derived food extracts from fruits and nuts were prepared as previously described [21]. Protein extract concentration was determined using the Bicinchoninic Acid Assay (Pierce Chemical Co., Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

Cloning strategy

PCR amplification of *S. kali* PME isoform Sal k 1.0103 was performed using the template previously cloned in the pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) vector [7]. Two specific oligonucleotides were designed: a sense primer with a *Nde*I restriction site (underlined), 5'- actcatATG CAGCCGATCCCCCT -3' that corresponds to the MQPIPP amino acid sequence (the N-terminal end of the mature protein), and an antisense primer, 5'- ttaCTCGAGCACTTTAGGTGGTGGTAG -3' with a *Xho*I restriction site (underlined) that corresponds to LPPPKV amino acids (C-terminal end of Sal k 1)

plus a stop codon. The amplified PCR product was then digested with *Nde*I and *Xho*I restriction enzymes and cloned into the pET41b plasmid (Invitrogen) in phase with a nucleotide sequence codifying for an 8xHis tag. This sequence is included in the expression vector at the C-terminus of the protein. The construct pET41b/Sal k 1.0103 was used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells to produce recombinant Sal k 1 according to [11].

Expression and purification of rSal k 1

The recombinant production of Sal k 1 was performed according to [11] with minor modifications. BL21(DE3) cultures were centrifuged at 6000 *g* for 20 min and reconstituted in sodium phosphate 20 mM pH 8.0 containing sodium chloride 0.5 M, imidazole 20 mM and phenylmethane-sulfonylfluoride 1 mM. After bacterial lysis by three cycles of freezing in N₂ and thawing at 42 °C, the soluble fraction containing rSal k 1 was clarified by centrifugation at 12000 *g* for 20 min, and subsequently loaded in an AKTA Purifier FPLC system (GE healthcare, Madrid, Spain) with a His Trap FF crude (GE healthcare) to purify the recombinant protein. The elution of the protein was performed using an isocratic gradient of 0.5 M imidazole in reconstitution buffer according to [22].

Sera and antibodies

Sera from 80 patients suffering from Amaranthaceae pollinosis were collected from three regions of Spain: Zaragoza, Murcia and Alicante (Supplementary Table 1). Written informed consent was obtained from all patients. Rabbit polyclonal antisera against the natural PME from *S. kali* pollen (pAb) was obtained by weekly injections of the protein (100 µg) in complete Freud's adjuvant. Horseradish peroxidase-labeled goat polyclonal antibody against rabbit IgG was obtained from Bio-Rad (Richmond, Calif). Mouse monoclonal antibody against human IgE and monoclonal antibodies 1.22.1 (mAb 1) and 1.3.1 (mAb 2) raised against nSal k 1 were provided by ALK-Abelló (Madrid, Spain). Horseradish peroxidase-labeled goat polyclonal antibody against mouse IgG was purchased from Pierce Chemical Co. Horseradish peroxidase-labeled mouse polyclonal antibody against the His-tag was from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

MS analysis and CD spectroscopy

MS of purified proteins was performed in a Bruker-Reflex IV MALDI-TOF (Bruker-Franzer Analytic, Bremen, Germany). The CD spectra recording and deconvolution of data was obtained in the far-UV, on a Jasco J-715 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan) according to [11]. Theoretical percentages of secondary structure were obtained with GOR [23].

Analytical procedures

SDS-PAGE was performed in 15% polyacrylamide gels. Proteins were stained with Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich). Molecular mass determinations were done with protein molecular mass markers SM0431 (Fermentas, Thermo Fisher Scientific). The concentration of the purified proteins was calculated by measuring the absorbance at 280 nm in a DU-7 spectrometer (Beckman, Madrid, Spain) using the theoretical extinction coefficient ($E^{0.1\%}$) of 1.1 of Sal k 1.0103 obtained using the ProtParam Software [24].

Immunological characterization

Immunoblotting procedures were developed as described previously [11] using individual human sera (diluted 1:10), anti-human IgE monoclonal antibody (diluted 1:3000) and anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled antibody or a rabbit polyclonal antiserum raised against nSal k 1 (diluted 1:50000) followed by anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-labeled polyclonal antibody (1:3000). Alternatively, a horseradish peroxidase-labeled mouse polyclonal antibody against Poly-His (1:2000) or monoclonal antibodies raised against nSal k 1 (1:200) followed by an anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled antibody (1:2500) were used. For immunoblotting inhibition assays an equivolumetric pool of sera (n=8) (diluted 1:10) was alternatively preincubated with PBS, 1 and 5 µg of rSal k 1 or nSal k 1. Protein bands were quantified by densitometry using the Multi Gauge Analysis software (Fujifilm, Barcelona, Spain) and referring the inhibition percentage to the control without inhibitor [13].

Indirect ELISA was performed as described [25] in 96-well plates coated with 100 ng of purified recombinant protein, 20 µg of pollen extract or 500 ng of pineapple stem bromelain [26] (Sigma-Aldrich). OD values >0.1 arbitrary units (mean + 3 x SD of the OD of the negative control) were considered positive. Inhibition assays were performed with an equivolumetric pool of human sera (n=8) (diluted 1:10), the anti-nSal k 1 polyclonal antiserum (diluted 1:50000) or monoclonal antibodies raised against nSal k 1 (1:10000), previously adsorbed to different concentrations of inhibitors ranging from 1 ng to 5 µg for pure proteins and 20 or 200 µg for the pollen and plant-derived food extracts. Binding of human IgE was detected by anti-human IgE monoclonal antibody (diluted 1:5000) followed by anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled antibody (diluted 1:2500). The binding of anti-nSal k 1 polyclonal antiserum was detected with the anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-labeled antibody (1:3000) and binding of mouse monoclonal antibodies with the anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled antibody (1:2500). The inhibition percentage was calculated according to the formula: inhibition (%) = [1-(Abs₄₉₂

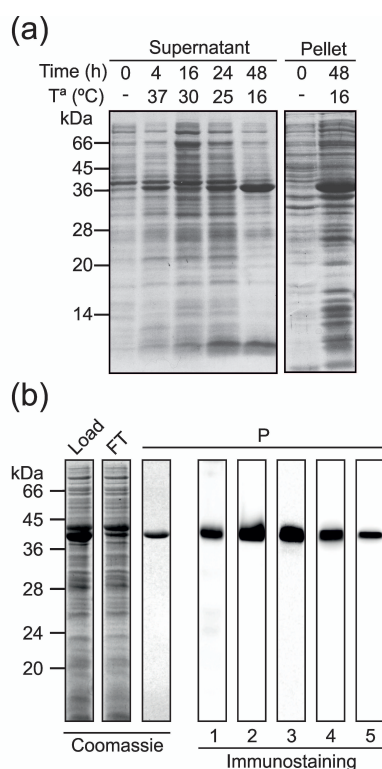


Fig. 1. Recombinant expression and purification of Sal k 1. a, SDS-PAGE analysis of the time-course of the recombinant expression of Sal k 1 in *E. coli* BL21(DE3) cells at indicated times of induction with IPTG and at different temperatures. b, SDS-PAGE of the purification process of rSal k 1 and immunostaining of nitrocellulose-blotted proteins with: 1, an equivolumetric pool of sera (n=5); 2 and 3, monoclonal antibodies (mAb 1 and mAb 2 respectively); 4, the polyclonal antiserum raised against nSal k 1; and 5, the polyclonal antibody against polyhistidine (poly-His). FT, flow-through; P, purified. Molecular mass markers are shown.

nm with inhibitor/Abs₄₉₂ nm without inhibitor)] x 100 [13].

The nonatopic controls were selected according to a nonallergic history and negative skin prick tests to the usual panel of respiratory allergens.

Basophil activation test (BAT)

This test was performed as previously described [27]. After blood-cell separation, 50 µL of each patient's cell suspension were incubated with 50 µL of indicated protein concentration. To evaluate background basal values without stimulation (negative control), we added 50 µL of stimulation buffer (cRPMI), containing IL-3 (2 ng/mL) in the cell suspension. As a positive control, a monoclonal anti-IgE anti-receptor antibody was used at a final concentration of 1 µg/mL. A positive response was concluded for values ≥15%, and stimulation index (antigen-specific response/basal level) ≥2.

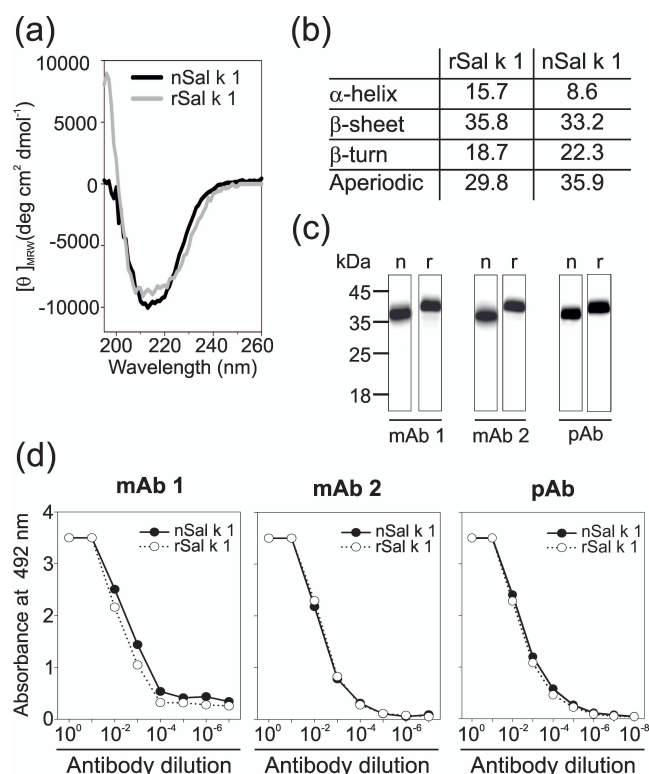


Fig. 2. Structural and antigenic properties of rSal k 1 in comparison to nSal k 1. a, Circular Dichroism spectra of nSal k 1 and rSal k 1 at a concentration of 200 ng/µl. b, Percentages of secondary structure of both proteins were obtained by deconvolution. c, SDS-PAGE and immunoblot of nitrocellulose-blotted 200 ng of natural and recombinant Sal k 1 with the monoclonal antibodies (mAb 1 and mAb 2) and the polyclonal antiserum (pAb) raised against nSal k 1. Molecular mass markers are shown. d, Titration of the mAb 1, mAb 2 and the pAb. ELISA plates were coated with 100 ng/well of rSal k 1 or nSal k 1.

Results

Cloning, recombinant production and purification of rSal k 1

In a previous manuscript, we reported the polymorphism character of Sal k 1 allergen and the sequencing of three different isoforms: Sal k 1.0101 (AY590141), Sal k 1.0102 (AY776249) and Sal k 1.0103 (AY776248), which showed 94 to 99% identity in their amino acid sequences [7].

Here, we aimed to express, purify and characterize a recombinant isoform of Sal k 1, which might be used as a replacement of nSal k 1 in diagnostic protocols. To this end, we amplified by PCR the cDNA-encoding the nucleotide sequence of Sal k 1.0103 without the 5' end codifying for the signal peptide, and cloned into the pCR2.1 vector. The cDNA was then subcloned into the expression vector pET41b, and the construct was subsequently used to transform BL21(DE3) cells to produce Sal k 1 as a protein tagged at the C-terminus with a 8xHis sequence.

Different temperatures and IPTG-induction times were surveyed and the supernatants and pellets resulted were analyzed by Coomassie Blue staining to determine the optimal conditions to produce rSal k 1. The highest yield of soluble recombinant protein was observed at 16 °C and 48 h of induction with 1 mM IPTG (Fig. 1a).

After chromatography, fractions containing the recombinant protein purified to homogeneity were pooled, dialyzed, concentrated and directly used in subsequent experiments. rSal k 1 was obtained with yields of approximately 7.5 mg/L of cell culture. The recombinant protein integrity and purity was verified by Coomassie Blue staining after SDS-PAGE and by immunostaining after transference to membranes with (i) a pool of sera from allergic patients to *Salsola kali*, (ii) two specific monoclonal antibodies (mAb 1 and mAb 2), (iii) one polyclonal antiserum raised against nSal k 1, and (iv) a polyclonal antibody directed against the His-tag (Fig. 1b). These experiments assessed the high purity of the recombinant allergen.

Then, we proceeded to characterize structurally and immunologically rSal k 1 in comparison to nSal k 1.

Structural characterization of rSal k 1

We first performed CD analyses using rSal k 1 and nSal k 1 at a concentration of 200 µg/ml (Fig. 2a). Similar CD spectra were obtained for both proteins.

We observed a higher α -helix content in rSal k 1 (7.1% more than nSal k 1), and minor differences ranging from 2.6 to 6.1% in the β -sheet, β -turn and non-periodic structure content (Fig. 2b).

Immunological characterization

We analyzed the antigenic properties of both recombinant and natural Sal k 1 by ELISA and western blot (WB) using two different mouse monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum raised against nSal k 1. By WB under denaturing conditions, we have observed that the ability of nSal k 1 and rSal k 1 to bind IgG from the monoclonal

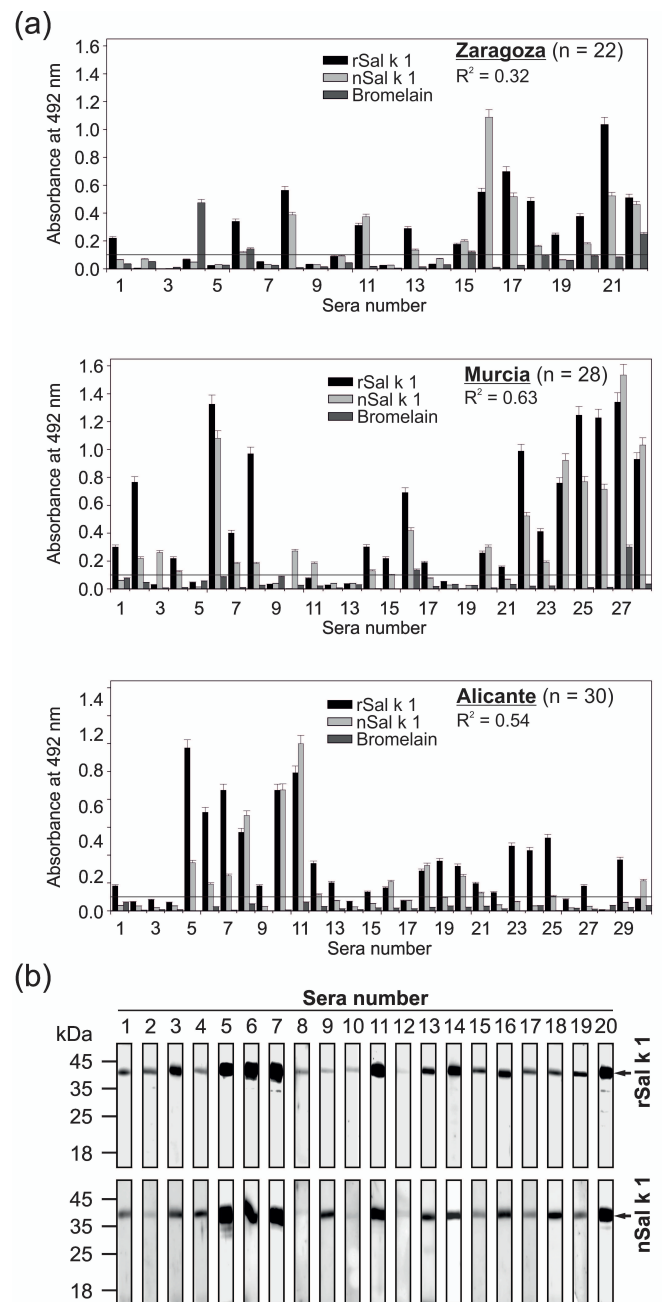


Fig. 3. Specific IgE-binding of rSal k 1 and nSal k 1. a, Determination of the IgE-binding ability of 80 individual sera from three regions of Spain to rSal k 1 (100 ng/well), nSal k 1 (100 ng/well) or bromelain (500 ng/well). Correlation coefficient (R²) among rSal k 1 and nSal k 1 IgE levels is also shown for each population. b, Analysis of the specific IgE-binding to 200 ng of nitrocellulose-blotted samples after SDS-PAGE under reducing conditions of 20 sera to rSal k 1 and nSal k 1. Molecular mass markers are shown.

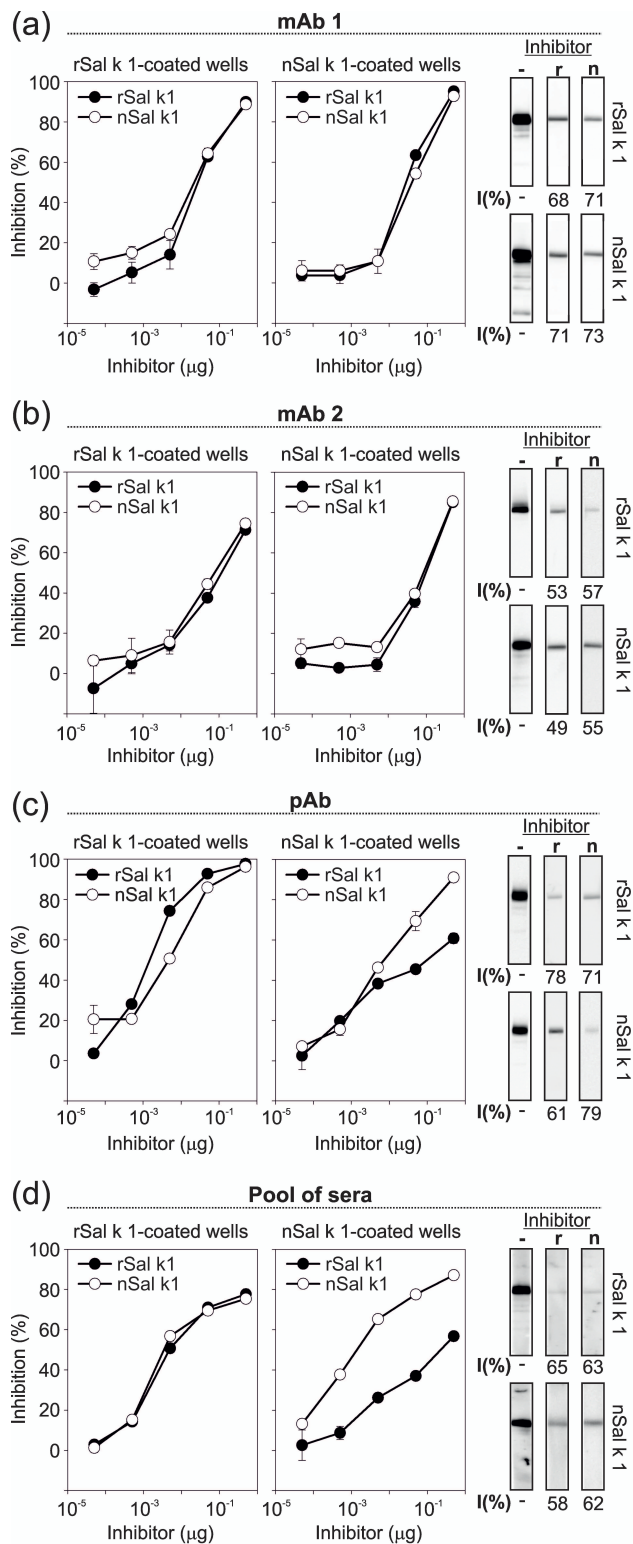


Fig. 4. Immunological characterization and validation of rSal k 1 in comparison with nSal k 1. a-b, Two monoclonal antibodies (mAb 1 and mAb 2) raised against nSal k 1; c, a polyclonal antisera (pAb) raised against nSal k 1; and d, an equivolumetric pool of eight randomly selected sera were tested by ELISA and immunoblotting to determine the IgE-binding inhibition ability of rSal k 1 and nSal k 1. In the ELISA experiments 100 ng/well of protein were coated and different amounts of inhibitor were used. In the immunoblotting assays under reducing conditions, 0.5 μg of each protein were blotted onto nitrocellulose membranes and 5 μg of inhibitor were used. Percentage of inhibition was calculated by densitometry of protein bands. (I%), inhibition percentage; (-), no inhibitor; (r), rSal k 1; (n), nSal k 1.

antibodies and the polyclonal antisera was also equivalent (Fig. 2c). ELISA titration of mAb 1, mAb 2 and the polyclonal antisera with rSal k 1 and nSal k 1

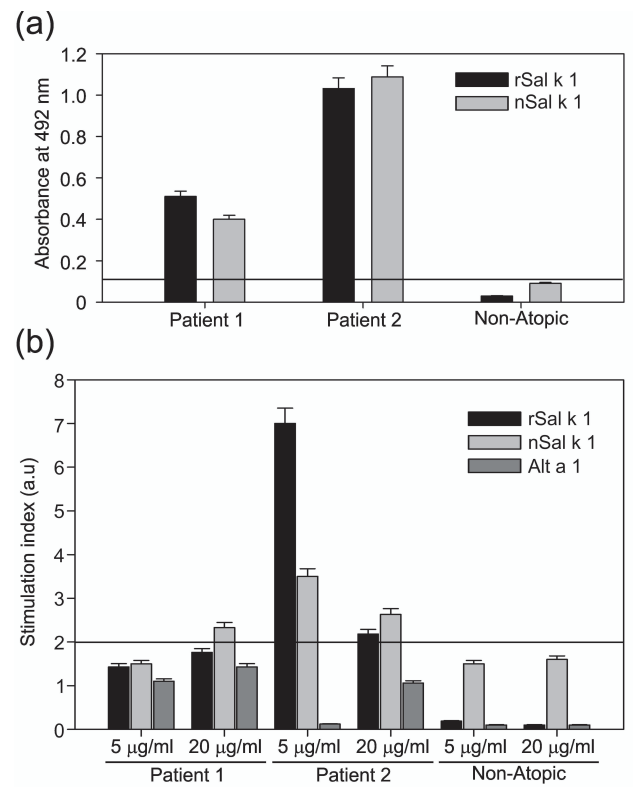


Fig. 5. Specific IgE values and basophiles activation assays. a, IgE levels quantified by ELISA of the selected *S. kali* pollen sensitized patients. b, stimulation index of basophiles activation test of patients allergic to *S. kali* pollen are shown. A non-atopic control was included in both assays.

showed that IgG-binding ability of both proteins was equivalent, suggesting that the antibodies recognize the epitopes in nSal k 1 and rSal k 1 in a similar manner (Fig. 2d).

We also evaluated the allergenic properties of both proteins by ELISA and WB. The prevalence of both natural and recombinant proteins was tested using sera of *S. kali* sensitized-patients from three different regions of Spain with significant differences in *S. kali* pollen counts (Fig. 3a). Recognition frequency was almost equivalent for both proteins: nSal k 1 (52%) and rSal k 1 (56%). Glycoprotein bromelain was tested in order to select those sera able to recognize the carbohydrate moiety of glycoallergens. Interestingly, only six out of the ninety patients tested were observed to have IgE-reactivity against the glycosidic fraction of bromelain (Fig. 3), indicating that the global contribution of the glycan moiety to the IgE-reactivity of Sal k 1 was not relevant. Correlation values obtained when comparing the IgE-binding ability of nSal k 1 and rSal k 1 were quite low, especially for the population of Zaragoza (Fig. 3b). Surprisingly, the regression analysis of the data seemed to indicate a slightly better IgE-binding of rSal k 1 by the sensitized patients than for nSal k 1 in all three populations studied (Fig. 3b).

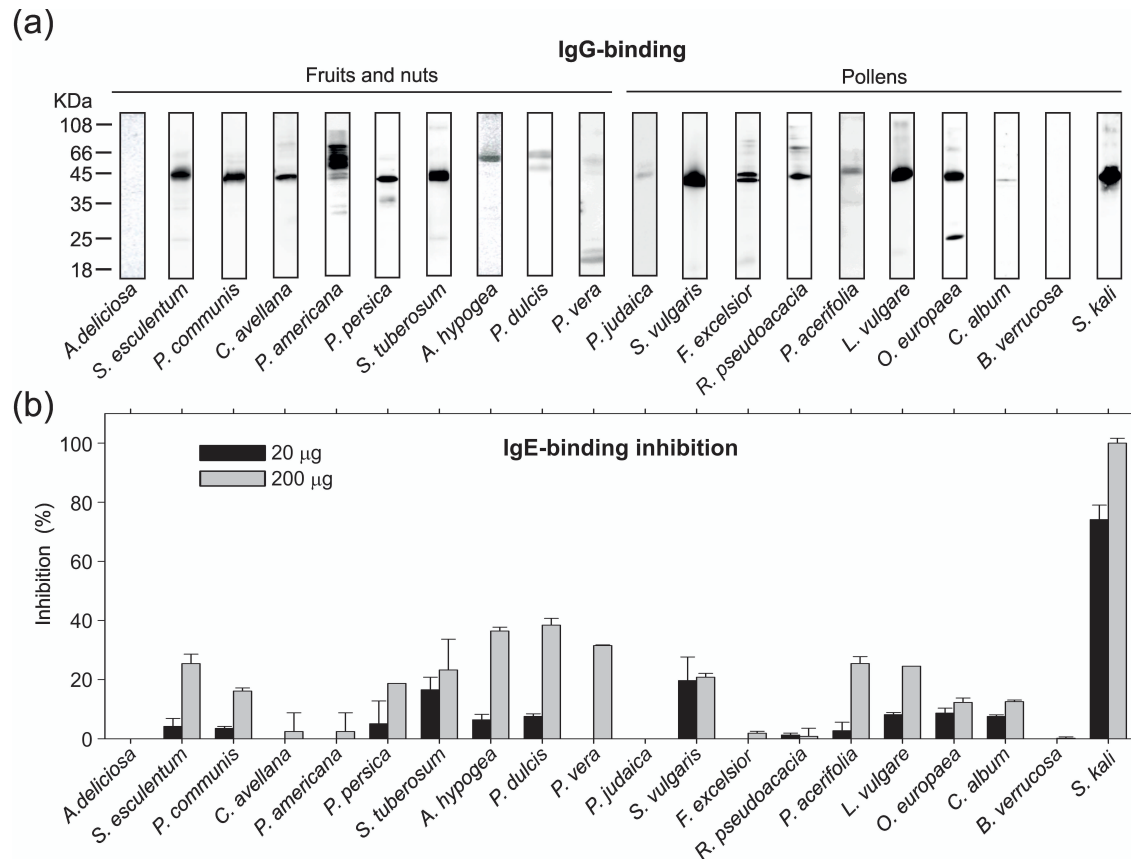


Fig. 6. Sal k 1 cross-react with PMEs from pollen and plant-derived foods. a, Detection of PMEs from different pollen and plant-derived food sources by immunoblotting using the pAb raised against Sal k 1. 20 µg of different pollen and plant-derived food protein extracts were blotted onto nitrocellulose membranes and immunostained with the pAb obtained against nSal k 1. Molecular mass markers are shown. b, The same pollen and plant-derived food protein extracts were tested by ELISA inhibition experiments using a pool of sera from allergic patients to *S. kali* against 0.1 µg/well of rSal k 1. 200 µg of *S. kali* and *Betula verrucosa* pollen protein extracts were used as positive and negative control, respectively.

Finally, we analyzed the IgE-binding ability of both proteins by WB under denaturing conditions to determine the role of the conformational epitopes in the IgE reactivity of the sera. We used a random set of twenty of the previously identified ELISA-positive sera (Fig. 3c). The correlation obtained ($r^2=0.94$), indicated that the IgE binding for the two proteins under denaturizing conditions was almost equivalent.

Collectively, these data indicate that rSal k 1 is able to span the antigenic and allergenic properties of Sal k 1 isoforms found in pollen.

Inhibition assays

We then analyzed the IgG- and IgE-equivalence of nSal k 1 and rSal k 1 by ELISA and WB inhibition experiments (Fig. 4).

The IgG binding to rSal k 1 was equivalent to that of nSal k 1 when using two monoclonal antibodies, whereas the experiments performed with the polyclonal antisera indicated that rSal k 1 was not able to completely inhibit the IgG binding to nSal k 1 (Fig. 4a-c).

Regarding the IgE-binding analysis by ELISA, it was observed a 30% reduction in the IgE-binding ability of rSal k 1 with respect to nSal k 1 in native conditions. Furthermore, by WB analyses nSal k 1 and rSal k 1 showed 67 and 64% of inhibition to nSal k 1, respectively, and 61 and 62% of inhibition to rSal k 1, respectively, and thus indicating that both proteins possessed similar IgE-inhibition capacity under denaturing conditions (Fig. 4d).

Basophil activation test

Three patients were selected to perform basophil activation test (Fig. 5). First, we tested the natural and the recombinant proteins by ELISA. A good correlation was observed for rSal k 1 and nSal k 1 (Fig. 5a). Then, we observed that rSal k 1 and nSal k 1 performed similarly in basophil activation test (Fig. 5b). At 20 µg/ml of rSal k 1 or nSal k 1, we observed similar results for IgE-positive patients, whereas at 5 µg/ml one patient showed higher activation of basophils. In contrast, the non-atopic control was non-responder at all concentrations and allergen tested (Fig. 5b).

Cross-reactivity

We tested a panel of pollen and plant-derived food extracts with anti-Sal k 1 polyclonal antiserum to identify those extracts able to potentially cross-react with rSal k 1 (Fig. 6a). Then, we surveyed the extracts described to contain allergenic PME by ELISA inhibition experiments to rSal k 1 using a random selected pool of 8 sera from *S. kali* sensitized patients (Fig. 6b).

Regardless the complete inhibition observed with *S. kali* pollen protein extract, *Platanus acerifolia* (plane tree) pollen protein extract showed the highest IgE-inhibition capacity, reaching 25% of inhibition (Fig. 6). Other IgG-positive PME pollen protein extracts-, *Ligustrum vulgare* (wild privet), *Syringa vulgaris* (common lilac) were also able to inhibit the IgE-binding to Sal k 1, reaching 24 and 20% of inhibition, respectively. There is scarce inhibition with *Olea europaea* (olive) or with the Amaranthaceae counterpart, *Chenopodium album* (Lamb's quarter). Regarding PME plant-derived food extracts, nuts from *Prunus dulcis* (almond), *Arachis hypogea* (peanut), *Pistacia vera* (pistachio) and fruits from *Solanum esculentum* (tomato), *Solanum tuberosum* (potato) and *Pyrus communis* (pear) were also shown to cross-react with Sal k 1 with inhibition percentages of 40, 38, 30, 23, 22 and 18%, respectively.

Discussion

The role of Amaranthaceae pollens as important sources of allergy has special relevance in countries with a desert climate, high temperatures and dry soil [17], and in extensive areas of the south of Europe which have suffered from an increase in the desertification process in the last years [4, 5]. Indeed, in south-eastern and central areas of Spain, *Salsola kali* pollen has become one of the first causes of seasonal allergy at almost the same level than olive and grass pollinosis [4, 5].

To date, five allergens from *S. kali* have been reported: the protein kinase homologue Sal k 2 (accession number: [Q8L5K9](#)), the methionine synthase Sal k 3 [10], the profilin Sal k 4 [11, 12], the Ole e 1-like allergen Sal k 5, and the here studied major allergen and *S. kali* specific marker -Sal k 1- [7].

Sal k 1 is a very polymorphic molecule with multiple protein spots identified by two-dimensional electrophoresis, with pI ranging from 5.9 to 7.7 and different glycosylation patterns [7]. Although this heterogeneity hampers the development of a suitable

purification procedure to obtain a consistent and reproducible batch of protein, a recombinant approach is especially helpful with this protein. Thus, our main concern about the production of Sal k 1 consisted in the obtaining of a recombinant protein able to be recognized by all sensitized patients to *S. kali*. As previously reported, non-glycosylated PMEs like that of *Diospyros kaki* conserved their 3D-folding and its enzymatic activity when comparing with other glycosylated PME [28]. Thus we decided to express Sal k 1-specific cDNA in bacteria because glycosylation should not be critical for the 3D-folding of PMEs [28] and it has also been successfully used to express other glycosylated allergens which maintained their structural and immunological properties [29, 30].

Remarkably, we performed an extensive characterization of rSal k 1 produced in *E. coli* in comparison to nSal k 1 to verify that the recombinant protein possessed similar structural and immunological properties than the natural protein isolated from pollen. Although we observed slight differences in the secondary structure between rSal k 1 and nSal k 1, we determined that the antigenic behavior of rSal k 1 was almost equivalent to nSal k 1. No significant differences were observed in the IgE-binding of both proteins under denaturing conditions, while in ELISA we observed that IgE binding was similar when both proteins were tested individually, biased towards a slightly better recognition to nSal k 1 (about 30% of reduced inhibition ability of rSal k 1 with respect to nSal k 1) when tested in inhibition experiments.

To determine if these differences in the IgE binding to rSal k 1 and nSal k 1 could be attributed to the glycosydic moieties -absent in rSal k 1-, or to conformational epitopes due to the differences observed at secondary structure composition, we also tested bromelain -a protein containing CCD-. Only a 6.6% of the patients showed specific IgE directed to the glycosydic fractions found in bromelain, and only one patient (1.1% of the population) showed correlation between the IgE reactivity to glycosydic moiety and the better recognition of the natural protein. Then, we could confirm that the contribution of the glycan moiety to the whole IgE-reactivity of nSal k 1 was not relevant in the assayed population, as it has also been reported for CCDs in a clinical context [31, 32].

Collectively, our results seemed to indicate that differences in the allergenic recognition with a subtle biased towards nSal k 1 should be attributed to the presence or absence of conformational epitopes or

amino acid changes inside of the epitopes due to the polymorphism of the natural protein which are able to induce changes in the affinity and specificity of the IgE antibodies. Finally, we further confirmed the equivalence of rSal k 1 and nSal k 1 by BAT. rSal k 1 was able to induce basophil activation from blood of *S. kali* pollen-sensitized patients at a similar level than nSal k 1, correlating BAT values with the IgE-levels to rSal k 1 and nSal k 1 of this selected population of sensitized patients. Remarkably, these data confirmed the usefulness of rSal k 1 for *in vitro* diagnosis.

We also investigated the potential role of Sal k 1 in cross-reactivity processes because several facts pointed out to a direct association of Sal k 1 to cross-reactivity processes: i) the conserved function of this protein family is associated to a well-conserved catalytic amino acid core across species [7, 15], which might be epitopes, target for IgE from sensitized patients, ii), the existence of allergenic PME's in pollen -Ole e 11 with prevalence ranging from 55.9% and 75.6% in three different olive pollen allergic populations [15]-, and in plant-derived foods like tomato [16, 17] or kiwi (Act d 7) with 32% of prevalence in patients sensitized to kiwi [18], and iii) because it has been recently published that Sal k 1 prevalence is higher in patients sensitized to plant-derived food and pollen than in patients only sensitized to pollen [14]. Here, we have confirmed the role of Sal k 1 in cross-reactivity as deduced from the inhibition experiments performed with a panel of plant-derived food and pollen extracts, which showed percentages of inhibition ranging from 9% to 24% with allergenic pollens and 18% to 40% with plant-derived food extracts.

In summary, this work shows that rSal k 1 i) was almost equivalent to nSal k 1 regarding its physicochemical properties, ii) spanned most of the allergenic properties of the natural isoforms present in *S. kali* pollen, and iii) was almost equivalent to nSal k 1 at allergenic level as demonstrated through immunological approaches and by histamine release. Accordingly, the data herein presented data provide evidences that rSal k 1 might substitute nSal k 1 in the diagnostic protocols actually used in clinics, and could be considered for a future use for immunotherapy protocols in *S. kali* pollen sensitized patients.

References

1. Chivato T, Valovirta E, Dahl R, de Monchy J, Bloch Thomsen A, Palkonen S, Jacobsen L. Allergy, living and learning: diagnosis and treatment of allergic respiratory diseases in Europe. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012; **22**:168-79.
2. Reid CE, Gamble JL. Aeroallergens, allergic disease, and climate change: impacts and adaptation. *Ecohealth* 2009; **6**:458-70.
3. Gadermaier G, Dedic A, Obermeyer G, Frank S, Himly M, Ferreira F. Biology of weed pollen allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* 2004; **4**:391-400.
4. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, Quiralte J, Lombardero M, Villalba M, Salcedo G, Rodríguez R. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* 2008; **63**:1550-8.
5. Colás C, Lezaun A. Russian thistle pollinosis: form allergen characterization to specific immunotherapy treatment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009; **14**:4652-7.
6. Lombardero M, Duffort O, Sellés JG, Hernández J, Carreira J. Cross-reactivity among Chenopodiaceae and Amaranthaceae. *Ann Allergy* 1985; **54**:430-6.
7. Barderas R, García-Selles J, Salamanca G, Colás C, Barber D, Rodríguez R, Villalba M. A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Clin Exp Allergy* 2007; **37**:1111-9.
8. Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodríguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; **127**:47-54.
9. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **113**:1192-8.
10. Assarehzadegan MA, Sankian M, Jabbari F, Tehrani M, Falak R, Varasteh A. Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen. *Mol Biol Rep* 2011; **38**:65-73.
11. Mas S, Barderas R, Colás C, Quiralte J, Rodríguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization. *FEBS J* 2012; **279**:4338-49.
12. Assarehzadegan MA, Amini A, Sankian M, Tehrani M, Jabbari F, Varasteh A. Sal k 4, a new allergen of *Salsola kali*, is profilin: a predictive value of conserved conformational regions in cross-reactivity with other plant-derived profilins. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; **74**:1441-6.
13. Castro L, Mas S, Barderas R, Colás C, García-Sellés J, Barber D, Rodríguez J, Villalba M. Sal k 5, a member of the widespread Ole e 1-like protein

- family, is a new allergen of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; **(In press)**.
14. Cuesta-Herranz J, Barber D, Blanco C, Cistero-Bahima A, Crespo JF, Fernández-Rivas M, Fernández-Sánchez J, Florido JF, Ibáñez MD, Rodríguez R, Salcedo G, García BE, Lombardero M, Quiralte J, Rodríguez J, Sánchez-Monge R, Vereda A, Villalba M, Alonso Díaz de Durana MD, Basagana M, Carrillo T, Fernández-Nieto M, Tabar AI. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; **153**:182-92.
 15. Salamanca G, Rodríguez R, Quiralte J, Moreno C, Pascual CY, Barber D, Villalba M. Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree. *FEBS J* 2010; **277**:2729-39.
 16. Kondo Y, Urisu A, Tokuda R. Identification and characterization of the allergens in the tomato fruit by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; **126**:294-9.
 17. Welter S, Lehmann K, Dolle S, Schwarz D, Weckwerth W, Scheler C, Worm M, Franken P. Identification of putative new tomato allergens and differential interaction with IgEs of tomato allergic subjects. *Clin Exp Allergy* 2013.
 18. Ciardiello MA, D'Avino R, Amoresano A, Tuppo L, Carpentieri A, Carratore V, Tamburrini M, Giovane A, Pucci P, Camardella L. The peculiar structural features of kiwi fruit pectin methylesterase: amino acid sequence, oligosaccharides structure, and modeling of the interaction with its natural proteinaceous inhibitor. *Proteins* 2008; **71**:195-206.
 19. Makatsori M, Pfaar O, Leonart R, Calderón MA. Recombinant allergen immunotherapy: clinical evidence of efficacy--a review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; **13**:371-80.
 20. Valenta R, Linhart B, Swoboda I, Niederberger V. Recombinant allergens for allergen-specific immunotherapy: 10 years anniversary of immunotherapy with recombinant allergens. *Allergy* 2011; **66**:775-83.
 21. Palomares O, Cuesta-Herranz J, Vereda A, Sirvent S, Villalba M, Rodríguez R. Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; **94**:586-92.
 22. Loughran ST, Walls D. Purification of poly-histidine-tagged proteins. *Methods Mol Biol* 2011; **681**:311-35.
 23. Garnier J, Gibrat JF, Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* 1996; **266**:540-53.
 24. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 1999; **112**:531-52.
 25. Marazuela EG, Hajek R, Villalba M, Barber D, Breiteneder H, Rodríguez R, Batanero E. A non-allergenic Ole e 1-like protein from birch pollen as a tool to design hypoallergenic vaccine candidates. *Mol Immunol* 2012; **50**:83-90.
 26. van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, Milazzo JP, Loutelier-Bourhis C, Rayon C, Villalba M, Koppelman S, Aalberse R, Rodríguez R, Faye L, Lerouge P. Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem* 2000; **275**:11451-8.
 27. Díaz-Perales A, Sanz ML, García-Casado G, Sánchez-Monge R, García-Sellés FJ, Lombardero M, Polo F, Gamboa PM, Barber D, Salcedo G. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **111**:628-33.
 28. Ciardiello MA, Tamburrini M, Tuppo L, Carratore V, Giovane A, Mattei B, Camardella L. Pectin methylesterase from kiwi and kaki fruits: purification, characterization, and role of pH in the enzyme regulation and interaction with the kiwi proteinaceous inhibitor. *J Agric Food Chem* 2004; **52**:7700-3.
 29. Bordas-Le Floch V, Bussières L, Airouche S, Lautrette A, Bouley J, Berjont N, Horiot S, Huet A, Jain K, Lemoine P, Chabre H, Batard T, Mascarell L, Baron-Bodo V, Tournet S, Nony E, Moingeon P. Expression and Characterization of Natural-Like Recombinant Der p 2 for Sublingual Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2012; **158**:157-67.
 30. Mittermann I, Zidarn M, Silar M, Markovic-Housley Z, Aberer W, Korosec P, Kosnik M, Valenta R. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**:1300-07.
 31. Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; **142**:99-115.
 32. Kaulfurst-Soboll H, Mertens M, Brehler R, von Schaewen A. Reduction of cross-reactive carbohydrate determinants in plant foodstuff: elucidation of clinical relevance and implications for allergy diagnosis. *PLoS One* 2011; **6**:e17800.

Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de *Salsola kali*

ARTÍCULO III

Identification of Sal k 6, an allergenic polygalacturonidase from *Salsola kali* pollen.



Identification of Sal k 6, an allergenic polygalacturonase of 40 kDa from *Salsola kali* pollen through the proteomic analysis of an IgE-reactive proteolytic band of 28 kDa

Salvador Mas^a, Javier Cuesta^b, Araceli Díaz-Perales^c, Carlos Colás^d, Domingo Barber^e, Rosalía Rodríguez^a, Mayte Villalba^a, Rodrigo Barderas^a

^aDpto. Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

^bHospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

^cCentro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

^dHospital Clínico Universitario 'Lozano Blesa', Zaragoza, Spain

^eALK-Abelló, Madrid, Spain. Current Address: Institute of Applied Molecular Medicine (IMMA), Universidad CEU San Pablo

Short title: An allergenic polygalacturonase of *S. kali* pollen

Keywords: Sal k 6, *Salsola kali* pollinosis, Amaranthaceae, Recombinant allergen, Cross-reactivity, Polygalacturonase, Amaranthaceae pollinosis

Corresponding author:

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Complutense

28040 Madrid, Spain

Fax: +34 91 3944159

Tel: +34 91 3944155

E-mail: rbarderas@quim.ucm.es

Acknowledgements:

We thank the excellent technical support of Sara Abián. This work was supported by grants SAF2008-04053 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, SAF2011-26716 from the Ministerio de Economía y Competitividad and RIRAAF Network RD12/0013/0015 from the ISCIII. R.B. is a fellow of the Ramón y Cajal program of the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

Introduction

Type I hypersensitivity diseases affects about 20-25% of the population of industrialized countries and its prevalence is in continuous growing.^{1,2} Among the different allergenic sources, pollen from plants is one of the most important agents able to induce type I hypersensitivities considering the number of patients affected and the inability of them to avoid being in contact with pollen, and thus producing seasonal allergic rhinitis, conjunctivitis or asthma as the acutest symptom.³

Russian thistle (*Salsola kali*) is an important source of anemophilous allergenic pollen which is easily spread over kilometers from its source of production. In large temperate areas from Middle Eastern countries, USA and Southern Europe this plant is becoming an important allergy-inducer,^{4,5} and mainly in those extensive regions where the desertification process is an important environmental problem. Five allergens have been characterized so far from this weed pollen: the specific allergenic marker Sal k 1,⁶ the protein quinase homologue Sal k 2, the cobalamin independent methionine synthase Sal k 3,⁷ the panallergen profilin Sal k 4,^{8,9} and the Ole e 1-like allergen Sal k 5.¹⁰ However, the study of the IgE-binding profile of *S. kali* sensitized patients by SDS-PAGE shows several unknown protein bands with important IgE-binding ability. A significant percentage of them (about 30% of the tested sera) show reactivity against a band of a molecular mass of about 28 kDa.

Based on this information, we have here performed the analysis of the *S. kali* IgE-binding protein profile by 2DE and *de novo* sequencing by mass spectrometry to study this relevant IgE-binding protein, which was identified as a protein belonging to the polygalacturonidase (PG) family of proteins. PGs are enzymes belonging to the pectinase group that catalyze the hydrolysis of α -1,4 glycosidic bonds localized in the polygalacturonan backbone of α -1,4 linked D-galacturonic acid residues, a component of the cell wall of plants. These enzymes are active in processes that involve degradation of the cell wall like ripening or abscission of fruit or pollen maturation.¹¹ The importance of this group of enzymes also resides in the fact that some pathogens like fungi use them to degrade plant cell wall, and then penetrate inside of the host.¹² These proteins have also significant value for industrial purposes,^{13,14} and three biological families of plants have been found to contain allergenic PGs: *Chamaecyparis obtusa* (Cha o 2)¹⁵, *Cryptomeria japonica* (Cry j 2)¹⁶ and *Juniperus ashei* (Jun a 2)¹⁷

from Cupressaceae family; *Platanus orientalis* (Pla o 2) and *Platanus acerifolia* (Pla a 2)¹⁸ from Platanaceae family; *Paspalum notatum* (Pas n 13)¹⁹, *Zea mays* (Zea m 13) and *Phleum pratense* (Phl p 13)²⁰ from Poaceae family.

To get further insights into the molecular properties of this new allergen, we have cloned and expressed it as a recombinant His-tag fusion protein in *Escherichia coli*. The structural and immunological properties of the recombinant protein were studied by CD, sera from allergic patients to *S. kali* and a specific mouse polyclonal antibody raised against the recombinant protein. Remarkably, we have measured the sIgE levels to Sal k 6 using the sera of 88 *S. kali* sensitized patients from three geographically different populations of *S. kali* sensitized patients, and the prevalence of the new allergen calculated. Finally, we have also studied the relevant role of Sal k 6 in pollen-pollen cross-reactivity, determining the absence of association of PGs in pollen-plant derived food cross-reactivity.

Materials and methods

Two-dimensional gel electrophoresis (2DE)

2DE was developed in a PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad). Isoelectric focusing was achieved under reducing conditions in the presence of 3 mM tributylphosphine by using 7 cm length, pH 3-10 linear ReadyStrip IPG gels (Bio-Rad). After isoelectrofocusing, proteins were separated by SDS-PAGE in 15% polyacrylamide gels under reducing conditions in the presence of 50 mM dithiothreitol and 3.7% iodoacetamide. 2DE were alternatively stained with silver reagent or transferred to nitrocellulose membranes for immunostaining with sera from allergic patients or a polyclonal antisera.

De novo mass spectrometry sequencing

S. kali pollen protein extract (75 μ g) were subjected to 2DE. Then, the obtained gel was incubated during 3 hours in 50% methanol containing 2% phosphoric acid, washed 3 times with ultrapure water, followed by an incubation during 1 hour in 33% methanol containing 17% ammonium sulphate and 3% phosphoric acid. Finally, the gel was stained with 0.06% Coomassie blue G-250 (Sigma-Aldrich, Química, Spain) during 16 hours. Then, the indicated spots were excised to perform peptide mass fingerprinting in the Proteomics Unit from the Faculty of Pharmacy of the UCM (Madrid).

Cloning of the allergenic polygalacturonase from *S. kali* pollen

A sense 5'-AAYACNGAYGGNATGCAYATH-3' and antisense 5'-DATRTGCATNCCRTCNGTRTT-3' degenerate oligonucleotides were designed from a partial amino acid sequence NTDGMHI obtained by peptide mass fingerprinting, which corresponds to a highly conserved amino acid region of PGs. We synthesized the cDNA from *S. kali* pollen total RNA using the SMART RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences, Clontech, Madrid, Spain). Then, we amplified by PCR the cDNA-encoding the 5' and 3' end of polygalacturonase from *S. kali*, using the previously described oligonucleotides and the universal primer mix contained in the same kit according to the manufacturer instructions. The PCR fragments obtained corresponding to partial cDNA sequences were cloned into the pCR2.1 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) and sequenced. From the previously sequenced fragments, a sense specific oligonucleotide was designed from the N-terminal end of *S. kali* PG 5'-aatcatATGCAGGGTCCCA TTGATATC-3', corresponding to the amino acid sequence QGPIDI containing a *Nde*I restriction site (underlined) without considering the signal peptide of *S. kali* PG (MKTFNLPLLVALFYLFVSVAR). An antisense specific oligonucleotide directed to the C-terminus was designed 5'-ttaCTCGAGTGGGGCA GCAGGGGTAGCAGG-3, which corresponds to the amino acid sequence PATPAAP and a *Xho*I restriction site (underlined). Finally, the cDNA-encoding the whole PG nucleotide sequence was subcloned, using the restriction enzymes *Nde*I and *Xho*I, into the pET41b plasmid (Novagen, Billerica, MA, USA) as a fusion protein linked to a 8 His-tag histidine in the C-terminus (His-tag).

Expression and purification of recombinant polygalacturonase

The pET41b/Salk6 construct was used to transform BL21(DE3) *E. coli* cells. LB containing 100 µg/ml kanamycin cultures of these cells were grown overnight, and then, diluted ten times and maintained at 37°C until an optical density at 600 nm reached a value of 1.0. At that moment, cell cultures were induced with 1 mM isopropyl thio-β-D-galactoside at indicated times and temperatures to identify the best conditions for the expression of the recombinant protein. Finally, the culture was centrifuged at 6000 g during 20 min at 4°C. Inclusion bodies were solubilized during 1 hour with 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole and 1 mM 2-

mercaptoethanol containing 6 M guanidine hydrochloride. This material was clarified by centrifugation at 12000 g during 30 min at 4°C and the supernatant filtered through 0.22 µm and applied at 0.5 ml/min into an His Trap FF crude (GE healthcare, Madrid, Spain). The column was washed with 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole and 1 mM 2-mercaptoethanol containing 6 M urea. Then, a 60 min gradient to 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole and 1 mM 2-mercaptoethanol was used to perform on-column refolding of the recombinant protein. The protein was then eluted using the same buffer but containing 0.5 M imidazole by an isocratic gradient. Finally, fractions containing the purified protein were visualized by SDS-PAGE, pooled and dialyzed against 20 mM ammonium bicarbonate.

Sera and antibodies

Sera from 88 patients from different regions of Spain, suffering from pollinosis to Amaranthaceae pollen were collected from Alicante (n=32), Zaragoza (n=28) and Murcia (n=28). Written informed consent was obtained from all patients.

Mouse polyclonal antisera against recombinant PG from *S. kali* pollen was obtained by weekly injections of the protein (1 µg) in complete Freud's adjuvant.²¹ Horseradish peroxidase-labeled goat polyclonal antibody against rabbit IgG was obtained from Bio-Rad (Richmond, Calif). Horseradish peroxidase-labeled goat polyclonal antibody against mouse IgG was purchased from Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill). Horseradish peroxidase-labeled mouse monoclonal antibody against His-tag was from Sigma-Aldrich.

MS analysis and CD

MS of purified protein was developed in a Bruker-Reflex IV MALDI-TOF (Bruker-Franzer Analytic, Bremen, Germany). The CD spectrum was recorded in the far UV on a JASCO J-715 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan) at a 200 µg/ml protein concentration in sodium phosphate 50 mM, pH 7.5 at room temperature. CDNN CD spectra deconvolution software (AppliedPhotophysics) was used to deconvolute the CD spectra recorded. Theoretical percentages of secondary structure were obtained with GOR.²²

Analytical procedures

SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 15% polyacrylamide gels. Proteins were stained with Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich). Molecular mass determinations were done with unstained protein molecular weight markers SM0431 (Fermentas).

The concentration of the purified recombinant PG was calculated by measuring the absorbance at 280 nm in a DU-7 spectrometer (Beckman) using the theoretical extinction coefficient ($\epsilon^{0.1\%}$) of 0.7 calculated with ProtParam. For pollen and plant-derived food extracts, the bicinchoninic acid protein assay reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) was used to determine the total concentration of proteins.

Immunological characterization

Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) after SDS-PAGE or 2DE. Membranes were incubated with individual human sera (diluted 1:10), anti-human IgE monoclonal antibody (diluted 1:5000) and anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled antibody. Alternatively, a mouse polyclonal antisera raised against rSal k 6 (diluted 1:50000) followed by an anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled polyclonal antibody (1:3000). Alternatively, a horseradish peroxidase-labeled mouse monoclonal antibody

against His-tag (1:2000) was used. For immunoblotting inhibition assays, individual sera or an equivolumetric pool of sera (n=5) (diluted 1:10) was preincubated with PBS, different amounts of recombinant PG or pollen and plant-derived food extracts. Chemiluminiscent signal was developed by ECL-Western blotting reagent (Amersham Bioscience).

Indirect ELISA was performed in 96 well plates coated with 200 or 50 ng of purified recombinant protein. Prevalence of Sal k 6 was calculated with sera from *S. kali* sensitized patients (diluted 1:10), taking as positive reactions those absorbances at 492 nm greater than three-fold the standard deviations above the mean of controls from non-atopic donors. For inhibition assays an equivolumetric pool of human sera (n=5) (diluted 1:10) or the specific polyclonal antisera raised against rSal k 6 (diluted 1:50000) were previously adsorbed to different concentrations of pollen and plant-derived food extracts as inhibitors. Binding of human IgE was detected by anti-human IgE monoclonal antibody (diluted 1:5000), followed by rabbit anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled antibody (diluted 1:2500) and the binding of anti-PG polyclonal antisera was detected by goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled antibody (1:2500). Signal was measured at 492 nm in an iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). In ELISA experiments with individual serum, absorbance values

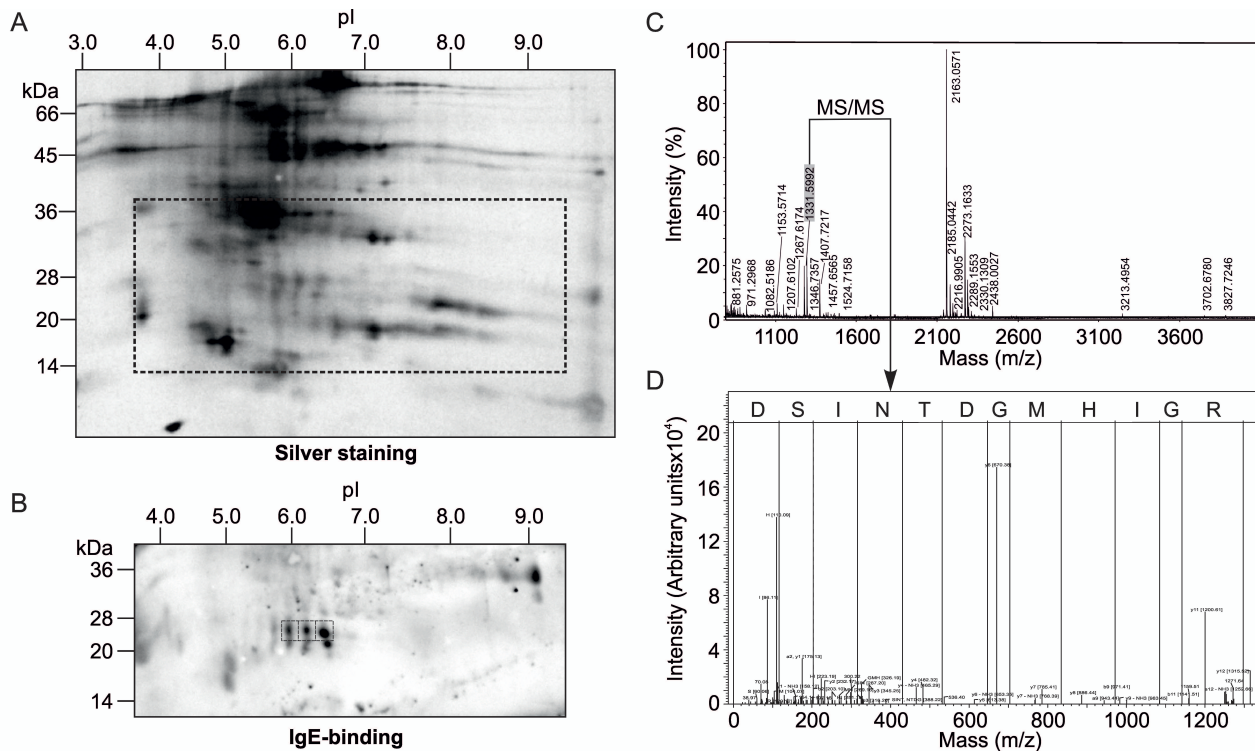


Figure 1. Identification of polygalacturonase as a new allergen of *S. kali* pollen. A) Silver staining of 75 μ g of *S. kali* pollen protein extract after two-dimensional electrophoretic separation. B) Identification of IgE-reactive spots in the Box highlighted in A by 2DE using an equivolumetric pool of sera (n=3) from *S. kali* sensitized patients. C) Boxed spots in B were excised and subsequently used for in-gel Trypsin digestion and mass fingerprinting analysis. D) Highlighted peptide in C was used for de novo MS/MS amino acid sequencing, showing at the top of the graph the amino acid sequence obtained. Molecular mass markers and pI are shown.

atgaagacattttaatctcccattggttgtagccctgttctacctgtttgtatctgtggcaagatcc	66
M K T F N L P L L V A L F Y L F V S V A R S	22
cagggtcccattgatatcacaaaatttggtgctaagcctaatgcagatgcaacatcggtctcttttg	132
Q G P I D I T K F G A K P N A D A T S A L L	44
gctgcctggaaggaagcgtgtgcagcagcagcgccagcgaaaatcgtagtgccagcaggagagttc	198
A A W K E A C A A A A P A K I V V P A G E F	66
ttgttgaatgccgtgaagcttcaaggtccatgcaaggctcctcttactattgaaattgctggaaac	264
L L N A V K L Q G P C K A P L T I E I A G N	88
ttcaaagcaccagcagatggtgcacagatgaaagggtgaagacacatgggttaagatcgagaatgtc	330
F K A P A D V A Q M K G E D T W V K I E N V	110
caaggcctcaccatcacttgtctcccaactggaggcactttcgatggccaagggaagccgcatgg	396
Q G L T I T C L P T G G T F D G Q G Q A A W	132
aagcagaacaagtgcgctcaaagcggcatgtgcaacagtccttccttacaatttttaggttcaacacc	462
K Q N K C A Q S G M C N S L P Y N F R F N T	154
ctgaccaatgctcagatcagcgggatcaaactctttgaacagcaagctgtaccacatgggagttatg	528
L T N A Q I S G I K S L N S K L Y H M G V M	176
gggtgcaaaaacattacactaacaggattgaccattgatgcaccaaggacagtctt <i>aacacagat</i>	594
G C K N I T L T G L T I D A P K D S L N T D	198
<i>ggtatgcacatt</i> ggacgatcaaattggggtgcatgccaccaactcaaagatcggtacaggagatgac	660
G M H I G R S N G V H A T N S K I G T G D D	220
tgtatctctatgggagatggggctgttgatgttcacgtcaggggtatcacctgtggacctggccat	726
C I S M G D G A V D V H V E G I T C G P G H	242
ggatcagtatcggaagcatgggtaagtctcgctaattgaggtcccaacactggatctttgtcaag	792
G I S I G S M G K F A N E A P N T G I F V K	264
aactgcagcttcacagacactgacaacggtgttaggatcaagtcttgatgaactcttttgaggct	858
N C S F T D T D N G V R I K S W M N S F E A	286
agcgcttctgatctccacttcgaggacatcaccggtaccaacgttttgaaccctgttatcatcgat	924
S A S D L H F E D I T V T N V L N P V I I D	308
caggagtactgcccctacaaccactgcaaggagaagactccatcaaagggttaagctcagcaagatc	990
Q E Y C P Y N H C K E K T P S K V K L S K I	330
agtttcaagaacgttcatggagctgcaaaatcagctgaagtcgtcaagctattgtgcagcagcgca	1056
S F K N V H G A A K S A E V V K L L C S S A	352
gttccctgtgatgggtgttgagctcgctgacatcgacatcgacctcactttcccctgggtggcgcg	1122
V P C D G V E L A D I D I D L T F P W W C R	374
tgtctcacagtgcaagaatcgtaagccgattgtcactggcaagcagaaccctgtcgcttgtggtg	1188
C L T V Q E S L S R L S L A S R T L S L V V	396
acctgctaccctgtgcccataa	1212
T C Y P C C P -	403

Figure 2. Nucleotide and amino acid sequences of PG from *S. kali* pollen. The signal peptide is highlighted in grey. The peptide obtained by de novo mass spectrometry is boxed with a continuous line. The nucleotide sequence used to design the oligonucleotides for Sal k 6 is highlighted in italics. Aspartic residues described to be involved in the enzymatic activity of PGs are boxed with a dashed line.

above 0.1 were taken as positives. The percentage of inhibition was calculated according to the next formula: inhibition (%) = $[1 - (\text{OD}_{492\text{nm}} \text{ with inhibitor} / \text{OD}_{492\text{nm}} \text{ without inhibitor})] \times 100$.

Basophil activation test (BAT)

This test was performed as previously described²³. After blood-cell separation, 50 µL of each patient's cell suspension were incubated with 50 µL of indicated

protein concentration. To evaluate background basal values without stimulation (negative control), we added 50 µL of stimulation buffer (cRPMI), containing IL-3 (2 ng/mL) in the cell suspension. As a positive control, a monoclonal anti-IgE antireceptor antibody was used at a final concentration of 1 µg/mL. A positive response was concluded for values $\geq 15\%$, and stimulation index (antigen-specific response/basal level) ≥ 2 .

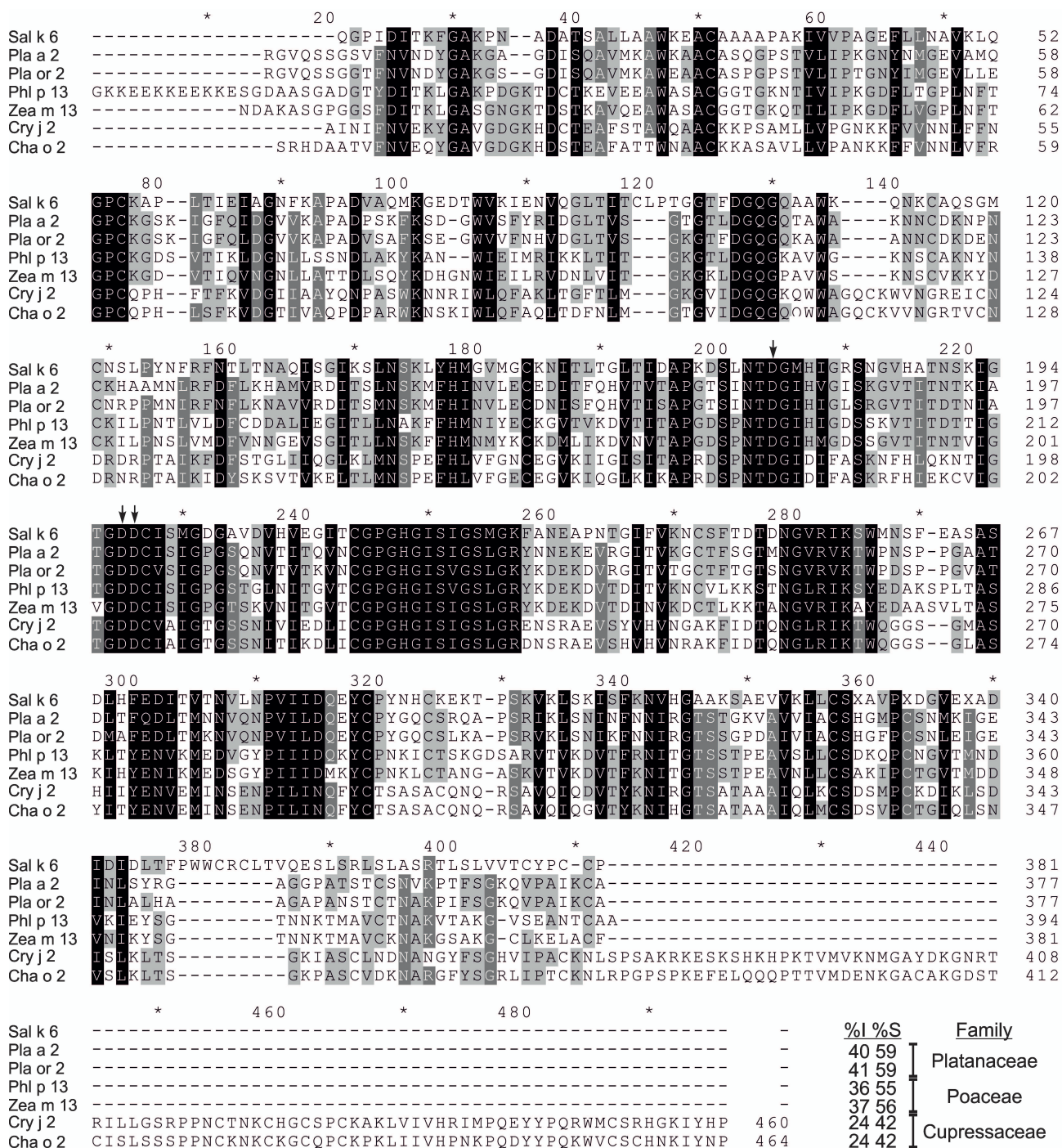


Figure 3. Alignment of Sal k 6 amino acid sequence with allergenic pollen PGs from indicated taxonomic plant families. Identity and similarity percentages were calculated using as reference Sal k 6. Arrows indicate the aspartic residues described to be involved in the enzymatic activity of PG.

Results

Identification of an IgE-reactive protein by *de novo* sequencing

In previously analyses we have observed the presence of a protein band of 28 kDa recognized by the IgE of 5 out of 22 Amaranthaceae pollen sensitized patients in *S. kali* nitrocellulose-blotted pollen protein extract samples (Fig S1). Our aim has been to identify and study the protein corresponding to this band.

First, we performed a 2DE analysis of *S. kali* pollen protein extract (Fig 1A). Then, we used a pool of sera

from allergic patients to *S. kali* to identify the protein spots corresponding to the 28 kDa band previously observed by 1D analysis. A group of spots was clearly visible at about 28 kDa and pI ranging from 5.9 to 6.5 with IgE-binding ability by 2DE (Fig 1B). The three squared spots in figure 1B were excised and analyzed by mass spectrometry (Fig 1C-D). After peptide mass fingerprinting of the three samples a peptide of 1331.6 Da corresponding to the DSINTDGMHIGR amino acid sequence was obtained. It possessed homology with the polygalacturonase family of proteins (Fig 1C-D).

Cloning, sequencing and analysis of the cDNA-encoding the allergen Sal k 6

The peptide obtained by mass spectrometry was used to design degenerated oligonucleotides to amplify by PCR the cDNA-encoding sequence codifying for the N-terminal and C-terminal end of the polygalacturonase of *S. kali*. Then, in a second round of PCR, we amplified the whole cDNA-encoding sequence by using specific oligonucleotides synthesized from the 5' and 3' end nucleotide sequence of the PG. This nucleotide sequence was deposited in the GeneBank® database with the accession number KC920919 and named Sal k 6 according to the allergen nomenclature (Fig 2). The presence of a secretion signal peptide in the N-

terminus of the DNA sequence obtained was deduced from the SignalP 4.0 (Fig 2).²⁴ This signal peptide, consisting of 66 nucleotides (22 amino acids), was removed from the cDNA-encoding sequence of Sal k 6 used to express the recombinant protein (Fig 3).

The analysis of the nucleotide sequence of Sal k 6 with ProtParam rendered a pI of 6.76 and a theoretical molecular mass of 40064.8 Da.²⁵ The comparison of the amino acid sequence of Sal k 6 with amino acid sequences of the allergenic polygalacturonases deposited in the IUIS database (www.allergen.org) rendered percentages of identity and similarity highly variable depending on the plant families such as Platanaceae -39 to 40% and 58% respectively- or Poaceae -36 to 37% and 55-56% respectively- which showed the highest percentages, whereas Cupressaceae (from 22 to 23% and from 40 to 41% respectively) showed the lowest percentages of identity and similarity (Fig 3). Despite the low identity percentages observed, the seven PGs compared shared the three aspartic residues described to be involved in the enzymatic activity of these proteins, and some large regions highly conserved (Fig 3).²⁶

Expression, purification and structural characterization of Sal k 6

The cDNA-encoding sequence of Sal k 6 was subcloned into the pET41b vector and directly used to transform BL21(DE3) *E. coli* cells to produce the recombinant protein fused to a His-tag in the C-terminal end.

The recombinant protein was observed to remain insoluble at all conditions tested, with the highest amount of protein obtained after 48 h of induction with IPTG at 16°C (Fig 4A). After solubilization of the inclusion bodies, we performed on-column refolding of the recombinant protein to subsequently elute the protein by an isocratic gradient of imidazole (Fig 4B). Fractions containing the purified recombinant protein were pooled, dialyzed and lyophilized, obtaining a final yield of 10 mg of purified protein per litre of cell culture.

The protein was then subjected to far-UV CD experiments and the percentages of secondary structure of rSal k 6 were calculated (Fig 4C). An α -helix content of 28.7%, β -sheet of 52.4% and a random coil of 18.7% were determined, which were in accordance with the high content in β -sheet of the PG family of proteins²⁷. Thus, we confirmed that the recombinant protein was correctly folded at secondary structure level (Fig 4C).

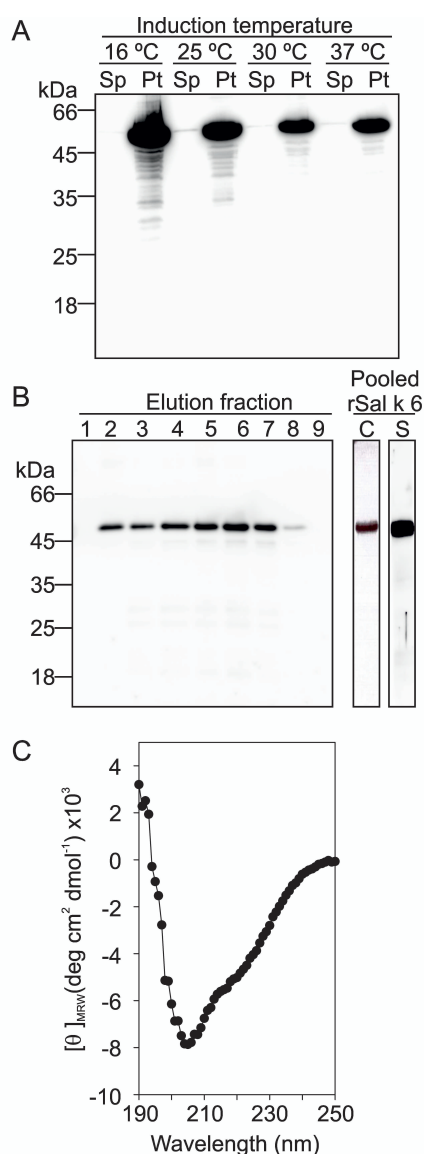


Figure 4. Expression, purification and structural characterization of PG from *S. kali* pollen. A) Analysis of the recombinant expression of Sal k 6 in *E. coli* BL21 (DE3) cells by SDS-PAGE at different temperatures and times of induction with 1mM IPTG. Sb, supernatant. Pt, pellet. B) Analysis of the purification by affinity chromatography of rSal k 6 by SDS-PAGE and immunostaining. C, Coomassie Blue staining. S, pool of five sera. C) Circular dichroism spectra of rSal k 6. Molecular mass markers are shown.

Assignment of the 28 kDa spots as a fragment of a high molecular mass allergen

PG subfamily of proteins are enzymes comprising heterogeneous molecular masses ranging from 39 to 60 kDa. These data are in agreement with the electrophoretic mobility of the purified recombinant protein of about 47 kDa calculated by SDS-PAGE and the theoretical molecular mass of 40064.8 Da calculated with the aminoacid sequence derived from the cDNA-encoding of Sal k 6. Then, we hypothesized that the 28 kDa protein spots used to obtain the PG sequence might be a degradation product of the higher molecular mass protein present in the *S. kali* pollen extract.

To address this question, we performed IgE-inhibition assays of *S. kali* pollen protein extract using rSal k 6 as inhibitor and sera from i) Sal k 6-positive patients, and ii) Sal k 6- and Sal k 1-positive patients

(Fig 5A). Remarkably, the IgE-inhibition experiments showed that the specific IgEs from Sal k 6-positive sera directed to bands of 28 and 47 kDa were completely abrogated with rSal k 6. However, the inhibition of the specific IgEs from Sal k 6- and Sal k 1-positive patients with rSal k 6 could only abrogate a protein band of 28 kDa, whereas the band of 47 kDa was partially inhibited due to the fact the electrophoretic mobility of the integral Sal k 6 and Sal k 1 (PME) is very similar.

Collectively, these data confirmed that the protein band of 28 kDa band with IgE-binding ability corresponds to a degradation product of Sal k 6, and then, validating the identification of the new allergen as a polygalacturonase.

Immunological properties of rSal k 6

Sera from *S. kali* sensitized patients from three different regions of Spain were tested by ELISA with rSal k 6 (Fig 5B-D). The global prevalence of rSal k 6

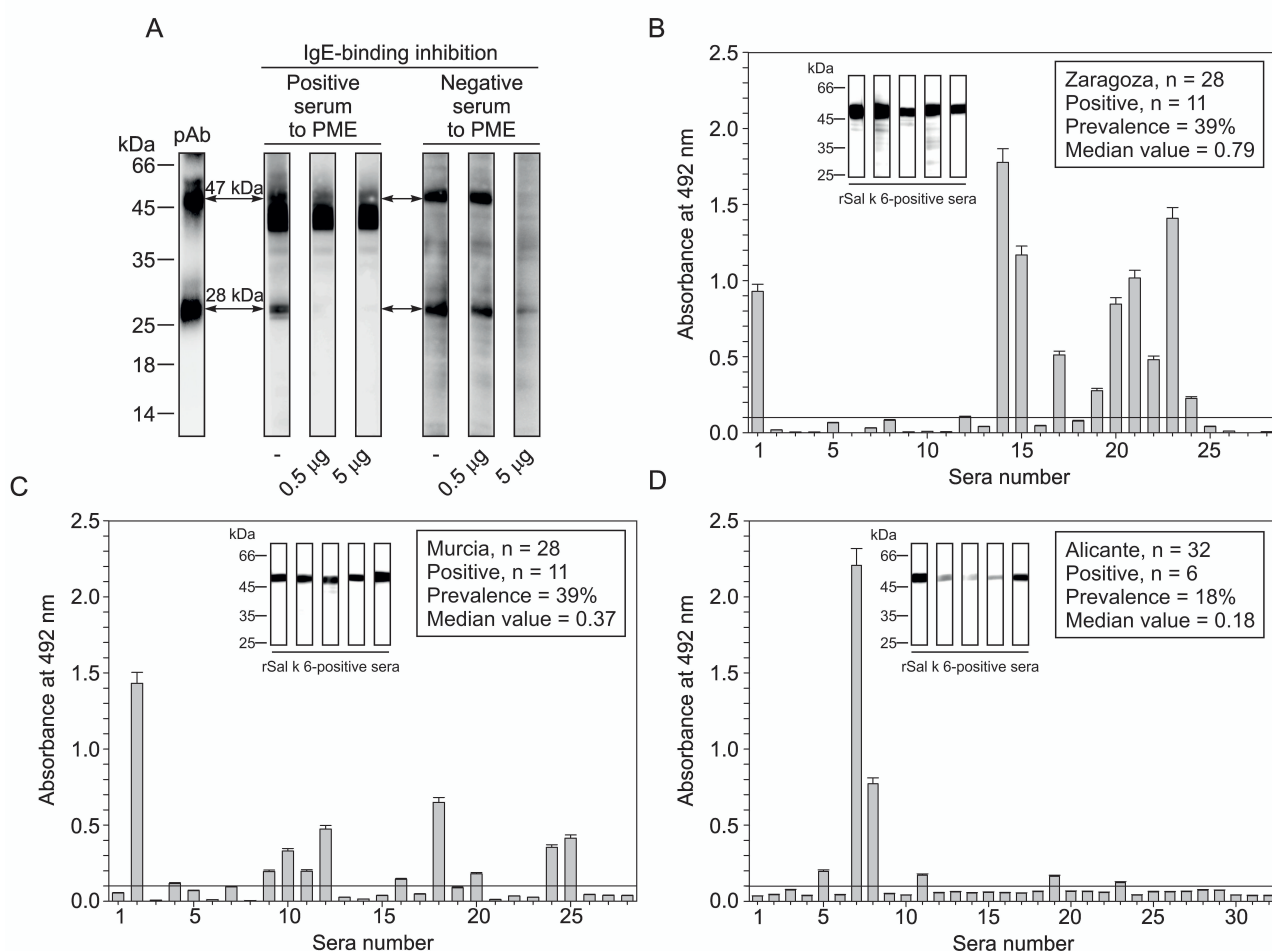


Figure 5. Assignment of the 28 kDa band as a fragment of a PG and analysis of the IgE reactivity of rSal k 6. A) Inhibition of the IgE-binding capability of two Sal k 6-positive patients (PME-positive and PME-negative sensitized patients sera) to natural PG from *S. kali* pollen using rSal k 6 as inhibitor. Bands of 28 kDa and 47 kDa corresponding to Sal k 6 were identified by using a polyclonal antisera raised against rSal k 6. B) Analysis of the sIgE levels of three populations of patients from Spain by ELISA and five random Sal k 6-positive sera from each population by immunoblotting (inset). Prevalence of the allergen is indicated. Potency of the allergen was calculated as the median value of the positive sera.

was calculated to be 30%, with prevalence values of 14, 39 and 39% for Alicante, Murcia and Zaragoza, respectively. Interestingly, these data correlate with the levels of grains/m³ of Amaranthaceae pollen observed in the three populations (Fig S2). The highest values of prevalence and potency of Sal k 6, determined as the mean value of the positive sera, were observed in the

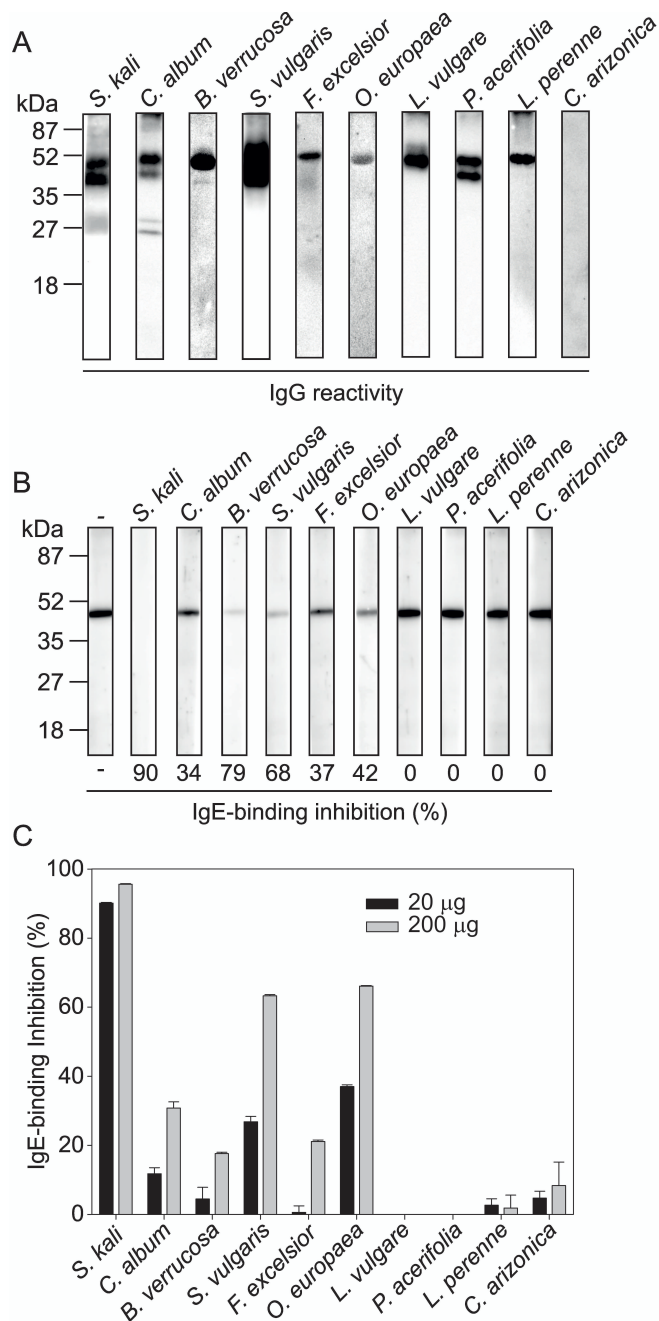


Figure 6. Identification of cross-reactive polygalacturonases from different pollen sources with Sal k 6. A) 40 µg of blotted pollen protein extracts were immunostained with a polyclonal antisera raised against recombinant Sal k 6 to identify potential cross-reactive PGs. B-C) Inhibition of the IgE-binding ability to 500 ng (B) or 200 ng (C) of rSal k 6 using different pollen protein extracts as inhibitors and a pool of Sal k 6-positive sera (n=5) by immunoblotting (B) or ELISA (C). Values of inhibition in percentage were calculated as the intensity lost in the samples inhibited regarding to the non-inhibited control (-) in B or according to: $[1 - (\text{OD}_{492\text{nm}} \text{ with inhibitor} / \text{OD}_{492\text{nm}} \text{ without inhibitor})] \times 100$ in C. Molecular mass markers are shown.

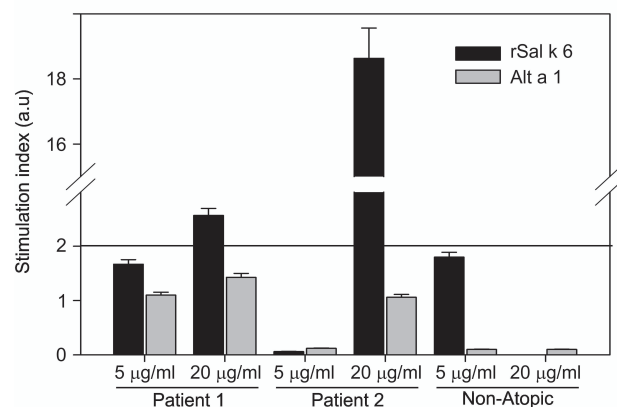


Fig. 7. Basophiles activation assays. Stimulation index of patients allergic to *S. kali* pollen and the non-atopic control patient at different concentrations of the allergens are shown.

population of Zaragoza, which possessed the highest amounts of grains/m³ of *S. kali* pollen during its flowering period (Fig S2).

IgE cross-reactivity of Sal k 6 with PGs from pollen and plant-derived food

Due to the presence in all allergenic PGs of highly conserved regions, we hypothesized a role of Sal k 6 in cross-reactivity processes. To address this question, we first detected the presence of potential PGs in pollen and plant-derived food extracts to be used in IgE-inhibition experiments. To this end, we produced two polyclonal antisera raised against rSal k 6 (Fig 6A). By ELISA, both polyclonal antisera were able to recognize equivalently the recombinant protein (Fig S3), and then, they were used to identify the corresponding natural protein present in *S. kali* pollen protein extract by immunoblotting. Interestingly, it was observed in *S. kali* pollen protein extract the presence of two bands with an electrophoretic mobility of 47 kDa protein band corresponding to the integral PG, and the product of degradation of Sal k 6 of 28 kDa (Fig 6B). Then, we analyzed the presence of potential cross-reactive PGs in other pollen and plant-derived food protein extracts. We observed the presence of polygalacturonases in all pollen protein extracts tested, whereas we did not detect any PG in plant-derived food extracts potentially able to cross-react with Sal k 6 (Fig 6B).

Second, to determine the potential role of PGs in IgE cross-reactivity with pollen and pollen-food cross-reactivity, we performed IgE-inhibition assays using the above tested protein extracts, sera from *S. kali* sensitized patients and rSal k 6 as inhibitor by ELISA and immunoblotting (Fig 6C-D). Surprisingly, only six out of the nine pollen protein extracts containing IgG-reactive PGs were able to inhibit the IgE-binding to rSal k 6 (Fig 6C-D). The maximum levels of IgE-

inhibition were observed for pollens from the Oleaceae family (*Fraxinus excelsior*, *Olea europaea* and *Siringa vulgaris*), with IgE-inhibition ranging from 20% to 60%, respectively. As expected due to the absence of IgG-reactive PGs in plant-derived food extracts (Fig 6B), no IgE-inhibition was observed with these protein extracts.

Basophil activation test (BAT)

Three patients were selected to perform BAT (Fig 7). A good correlation between specific IgE quantitation by ELISA (Patient 1: 0.92; Patient 2: 0.34 and the Non-Atopic control: 0.02) and BAT (Fig 7) was observed in the two allergic patients and the non-atopic control. At 20 µg/ml of rSal k 6 we observed positive activation in both allergic patients, whereas at 5 µg/ml activation of basophils was not observed for any of the patients. In contrast, the non-atopic control was non-responder at all concentrations and allergen tested.

Discussion

S. kali is an important allergy-inducing agent in temperate countries such as Spain, Middle Eastern or USA, where not only the desertification process and its use in greening programs has increased the presence of this weed in the Spanish flora but also the pollution derived from oil industries have largely increased the number of patients sensitized to *S. kali*. In Spain, this weed can be found in almost the whole territory, but some large regions -the South-East coast and the Center-East- are more likely to have a higher presence of this weed and a very important number of pollen counts during its flowering period.

The knowledge of the allergenic components present in an allergenic biological source facilitates its diagnosis and the clinical treatment of patients suffering from type I hypersensitivity, mainly through the standardization of the extracts according to the relevant allergens present in an allergenic source. In *S. kali* pollen, several allergens have been described so far: the specific allergenic marker Sal k 1,⁶ the protein kinase homologue Sal k 2, the cobalamin independent methionine synthase Sal k 3, the profilin Sal k 4,⁸ and the Ole e 1-like protein Sal k 5¹⁰. However, several relevant bands corresponding to proteins with IgE-binding ability can be observed when analyzing the allergen profile of *S. kali* by immunostaining using sera from *S. kali* pollen sensitized patients. In this sense, it has been observed by ELISA that about 30% of the *S. kali* patients sensitized tested were able to recognize an unknown IgE-reactive band of about 28 kDa. In this work, we have been able to identify by

2DE and *de novo* sequencing by mass-spectrometry those spots corresponding to the 28 kDa band as a fragment of a PG enzyme (EC 3.2.1.15) that belongs to the glycosyl hydrolases family 28. PGs are involved in the hydrolysis of glycosidic bonds and specifically catalyze the hydrolysis of 1,4- α -D-galactosiduronic linkages in pectate and other galacturonans, and thus being involved in cell wall metabolism during ripening.²⁸ This group of molecules displays heterogeneous molecular masses ranging from 39 to 60 kDa, and some of them have been described as allergens^{16, 19, 20}. Although the molecular mass of the identified fragment did not correspond to this molecular mass, we demonstrated by inhibition experiments using the whole allergenic molecule rSal k 6 that this fragment unequivocally corresponded to a degradation product from a PG of electrophoretic mobility of 47 kDa with IgE-binding ability. Probably, the integral PG allergen has remained unnoticed because the marker of sensitization of *S. kali* pollen – the PME Sal k 1- shares similar physicochemical properties than the integral Sal k 6. In this sense, as Sal k 1 possessed a similar molecular mass and an electrophoretic mobility of about 40 kDa⁶, Sal k 6-positive patients could have been wrongly identified by SDS-PAGE as Sal k 1-positive patients.

To date, there are only three plant families described to contain allergenic PGs: Platanaceae, Poaceae and Cupressaceae.¹⁵⁻²⁰ In this work, we have identified not only the Amaranthaceae family as a new plant family containing allergenic pollen PGs but also we have further demonstrated the presence of cross-reactive PGs in pollen from the Oleaceae and Betulaceae families. Interestingly, we observed higher identity and similarity values between Sal k 6 with PGs from related than non-related phylogenetically allergenic PGs. In this sense, PGs from Platanaceae and Poaceae families belonging to the taxonomic division Magnoliophyta shared the highest percentages of identity and similarity with PG from *S. kali*–40 to 41% and 60 to 61%, respectively-, whereas PG from the Cupressaceae family belonging to the division Pinophyta showed the lowest identity and similarity percentages with Sal k 6 and PGs from the other two families -26 to 28% and from 42 to 45%, respectively. Moreover, the PG from *S. kali* pollen, belonging to the Magnoliophyta division showed intermediate percentages of identity and similarity -36 to 40% and 55 to 58%, respectively- with Magnoliophyta-related sources and 22-23% and 40-41% with Pinophyta-related sources. Remarkably, despite the important differences in the amino acid sequences of the indicated allergenic PGs, these molecules shared

highly conserved regions, especially in those amino acids close to the residues involved in the enzymatic activity (Fig S5)²⁶, and then, supporting a potential implication of Sal k 6 in cross-reactivity processes.

Sal k 6 was observed to be a minor allergen in the three populations of sera tested with a prevalence ranging 19% and 39% of *S. kali* sensitized patients and we confirmed the capability of rSal k 6 of induce basophils activation from blood of *S. kali* pollen-sensitized patients. Remarkably, we observed a clear correlation between the counts of grains of Amaranthaceae pollen in the atmosphere appearing in the three regions tested, and the prevalence and the sIgE levels to Sal k 6 in the sensitized patients. In this sense, although the prevalence for rSal k 6 was similar in the sensitized patients from Zaragoza and Murcia, the potency of the allergen in Zaragoza was higher, which correlated with the highest counts of pollen observed in this region. On the other hand, sera from sensitized patients from Alicante showed the lowest prevalence and potency of the allergen, which again correlated with the lowest counts of grains of Amaranthaceae pollens. Collectively, these data seem to indicate the high importance of the count levels of Amaranthaceae pollen with the potency and prevalence of Sal k 6.

Remarkably, we investigated the potential association of Sal k 6 in pollen-pollen and pollen-plant polysensitization. First, the presence of potential PGs able to cross-react with Sal k 6 in several allergenic pollens from related and non-related plant families by using polyclonal antisera raised against Sal k 6 was determined. The absence of potential PGs sharing IgG epitopes with Sal k 6 in plant-derived food extracts pointed out to only a potential implication of Sal k 6 in pollen-pollen cross-reactivity. Interestingly, as depicted by the experiments with the polyclonal antisera, we observed that the pollens having IgG cross-reactive PG were those from Magnoliophyta division, which showed the highest identity and similarity percentages with Sal k 6, whereas pollen from Pinophyta division, which did not show IgG cross-reactivity, showed the lowest percentages of identity and similarity with Sal k 6. Secondly, we confirmed the implication of Sal k 6 in IgE cross-reactivity processes by means of IgE-inhibition experiments. As expected from the antigenic behaviour, we only observed pollen-pollen IgE cross-reactivity and a total absence of cross-reactivity with plant-derived food extracts. Remarkably, the highest IgE inhibition values were observed with those pollens from phylogenetically related plant families, with no

inhibition observed with pollen from plants belonging to Poaceae, Platanaceae or Cupressaceae families.

In summary, the here presented work shows that Sal k 6 is a relevant allergen of *S. kali* pollen and is implicated in pollen-pollen cross-reactivity. Although neither IgG nor IgE cross-reactive PG was found in plant-derived foods, we can not discard the presence of allergenic PGs in other plant-derived food extracts. Finally, the production of the recombinant PG has demonstrated to be a good approach to study the allergenic character of this protein, making rSal k 6 a good candidate to deep in the allergenic properties of this family of allergens.

References

1. Eder W, Ege MJ, von Mutius E. The asthma epidemic. *N Engl J Med* 2006;355:2226-35.
2. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet* 2006;368:733-43.
3. Dahl R, Andersen PS, Chivato T, Valovirta E, de Monchy J. National prevalence of respiratory allergic disorders. *Respir Med* 2004;98:398-403.
4. Barber D, de la Torre F, Feo F, Florido F, Guardia P, Moreno C, et al. Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study. *Allergy* 2008;63:1550-8.
5. Colás C, Monzón S, Venturini M, Lezaun A. Double-blind, placebo-controlled study with a modified therapeutic vaccine of *Salsola kali* (Russian thistle) administered through use of a cluster schedule. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:810-6.
6. Barderas R, García-Sellés J, Salamanca G, Colás C, Barber D, Rodríguez R, et al. A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1111-9.
7. Assarehzadegan MA, Sankian M, Jabbari F, Tehrani M, Falak R, Varasteh A. Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen. *Mol Biol Rep* 2011;38:65-73.
8. Mas S, Barderas R, Colás C, Quirarte J, Rodríguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization. *FEBS J* 2012;279:4338-49.
9. Assarehzadegan MA, Amini A, Sankian M, Tehrani M, Jabbari F, Varasteh A. Sal k 4, a new allergen of *Salsola kali*, is profilin: a predictive value of conserved conformational regions in cross-reactivity with other plant-derived profilins. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010;74:1441-6.

10. Castro L, Mas S, Barderas R, Colás C, García-Sellés J, Barber D, et al. Sal k 5, a member of the widespread Ole e 1-like protein family, is a new allergen of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;(In press).
11. Hadfield KA, Bennett AB. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiol* 1998;117:337-43.
12. Bezier A, Lambert B, Baillieul F. Cloning of a grapevine Botrytis-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related hsr203J. *J Exp Bot* 2002;53:2279-80.
13. Sandri IG, Fontana RC, Barfknecht DM, da Silveira MM. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *Lwt-Food Science and Technology* 2011;44:2217-22.
14. Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* 2001;77:215-27.
15. Zhou X, Zhang Y, Niklas KJ. Sensitivity of growth and biomass allocation patterns to increasing nitrogen: a comparison between ephemerals and annuals in the Gurbantunggut Desert, north-western China. *Ann Bot* 2013.
16. Namba M, Kurose M, Torigoe K, Hino K, Taniguchi Y, Fukuda S, et al. Molecular cloning of the second major allergen, Cry j II, from Japanese cedar pollen. *FEBS Lett* 1994;353:124-8.
17. Yokoyama M, Miyahara M, Shimizu K, Kino K, Tsunoo H. Purification, identification, and cDNA cloning of Jun a 2, the second major allergen of mountain cedar pollen. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:195-202.
18. Ibarrola I, Arilla MC, Martínez A, Asturias JA. Identification of a polygalacturonase as a major allergen (Pla a 2) from *Platanus acerifolia* pollen. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1185-91.
19. Davies JM, Voskamp A, Dang TD, Pettit B, Loo D, Petersen A, et al. The dominant 55 kDa allergen of the subtropical Bahia grass (*Paspalum notatum*) pollen is a group 13 pollen allergen, Pas n 13. *Mol Immunol* 2011;48:931-40.
20. Suck R, Petersen A, Hagen S, Cromwell O, Becker WM, Fiebig H. Complementary DNA cloning and expression of a newly recognized high molecular mass allergen phl p 13 from timothy grass pollen (*Phleum pratense*). *Clin Exp Allergy* 2000;30:324-32.
21. Barral P, Villalba M, Rodríguez R, Batanero E. The role of major olive pollen allergens Ole e 1, Ole e 9, and Ole e 10 on mice sensitization. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:466-71.
22. Kloczkowski A, Ting KL, Jernigan RL, Garnier J. Combining the GOR V algorithm with evolutionary information for protein secondary structure prediction from amino acid sequence. *Proteins* 2002;49:154-66.
23. Díaz-Perales A, Sanz ML, García-Casado G, Sánchez-Monge R, García-Sellés FJ, Lombardero M, et al. Recombinant Pru p 3 and natural Pru p 3, a major peach allergen, show equivalent immunologic reactivity: a new tool for the diagnosis of fruit allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:628-33.
24. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 2011;8:785-6.
25. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 1999;112:531-52.
26. van Santen Y, Benen JA, Schröter KH, Kalk KH, Armand S, Visser J, et al. 1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1999;274:30474-80.
27. Rozeboom HJ, Beldman G, Schols HA, Dijkstra BW. Crystal structure of endo-xylogalacturonan hydrolase from *Aspergillus tubingensis*. *FEBS J* 2013;280:6061-9.
28. Lagaert S, Belien T, Volckaert G. Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:1064-73.

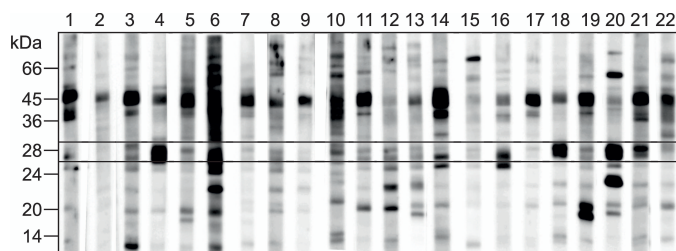


Fig S1. Immunostaining of 40 μ g of pollen protein extract from *S. kali* with individual sera from *S. kali* pollen sensitized patients. The band of about 28 kDa is highlighted. Molecular mass markers are shown.

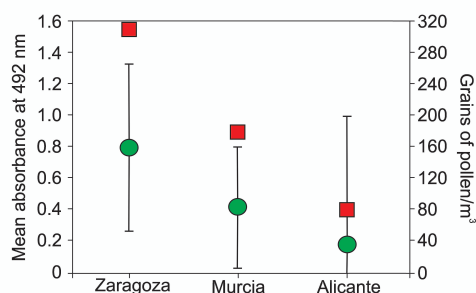


Fig S2. Allergenic potency of rSal k 6 in the three populations of sensitized patients to *S. kali* pollen from Spain was calculated as the mean absorbance (green circle) at 492 nm of the rSal k 6-positive patients. Standard deviation is also included in the graph. The count level of grains/m³ of Amaranthaceae pollen in the three regions of precedence of the sera is also indicated (red square).

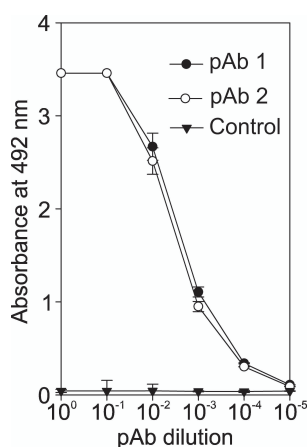


Fig S3. Titration of the two polyclonal antisera raised against rSal k 6 in comparison to a control IgG against rSal k 6 (50 ng) by ELISA.

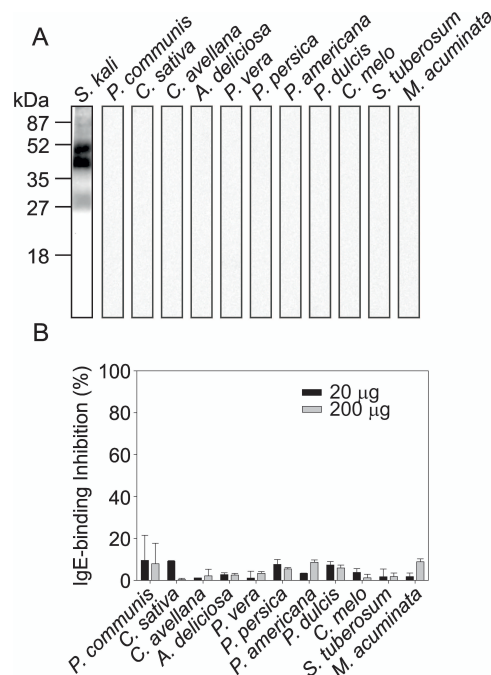


Fig S4. Absence of cross-reactive polygalacturonases from different plant-derived food sources with Sal k 6 was confirmed by immunostaining and IgE-inhibition experiments. **A)** 40 μ g of blotted pollen protein extracts were immunostained with a polyclonal antisera raised against recombinant Sal k 6 to identify potential cross-reactive PGs. **B)** Inhibition of the IgE-binding ability to 200 ng of rSal k 6 using different pollen protein extracts as inhibitors and a pool of Sal k 6-positive sera (n=5) by ELISA. Values of inhibition in percentage were calculated according to: $[1 - (\text{OD}_{492\text{nm}} \text{ with inhibitor} / \text{OD}_{492\text{nm}} \text{ without inhibitor})] \times 100$. Molecular mass markers are shown.

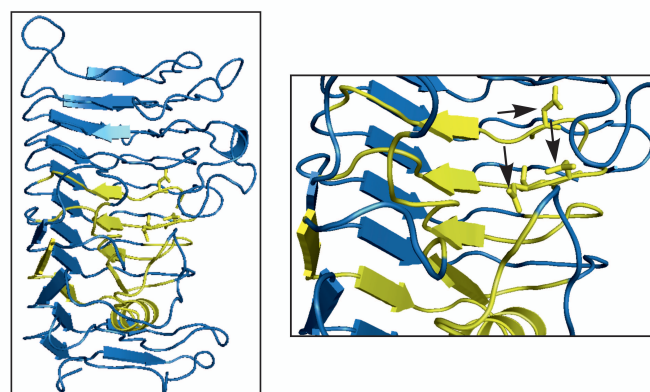


Fig S5. Three-dimensional representation of polygalacturonase from *S. kali* pollen using as template the endopolygalacturonase from *Asperillus niger* (1c2f). In yellow are highlighted the most conserved amino acid regions of the protein. Arrows indicate the aspartic residues involved in the catalytic activity of PGs.

Bloque II. Estudio del polen de *Fraxinus excelsior* como una fuente alérgica relevante en Europa

ARTÍCULO IV

Ash pollen immunoproteomics: identification, immunological characterization and sequencing of six new allergens

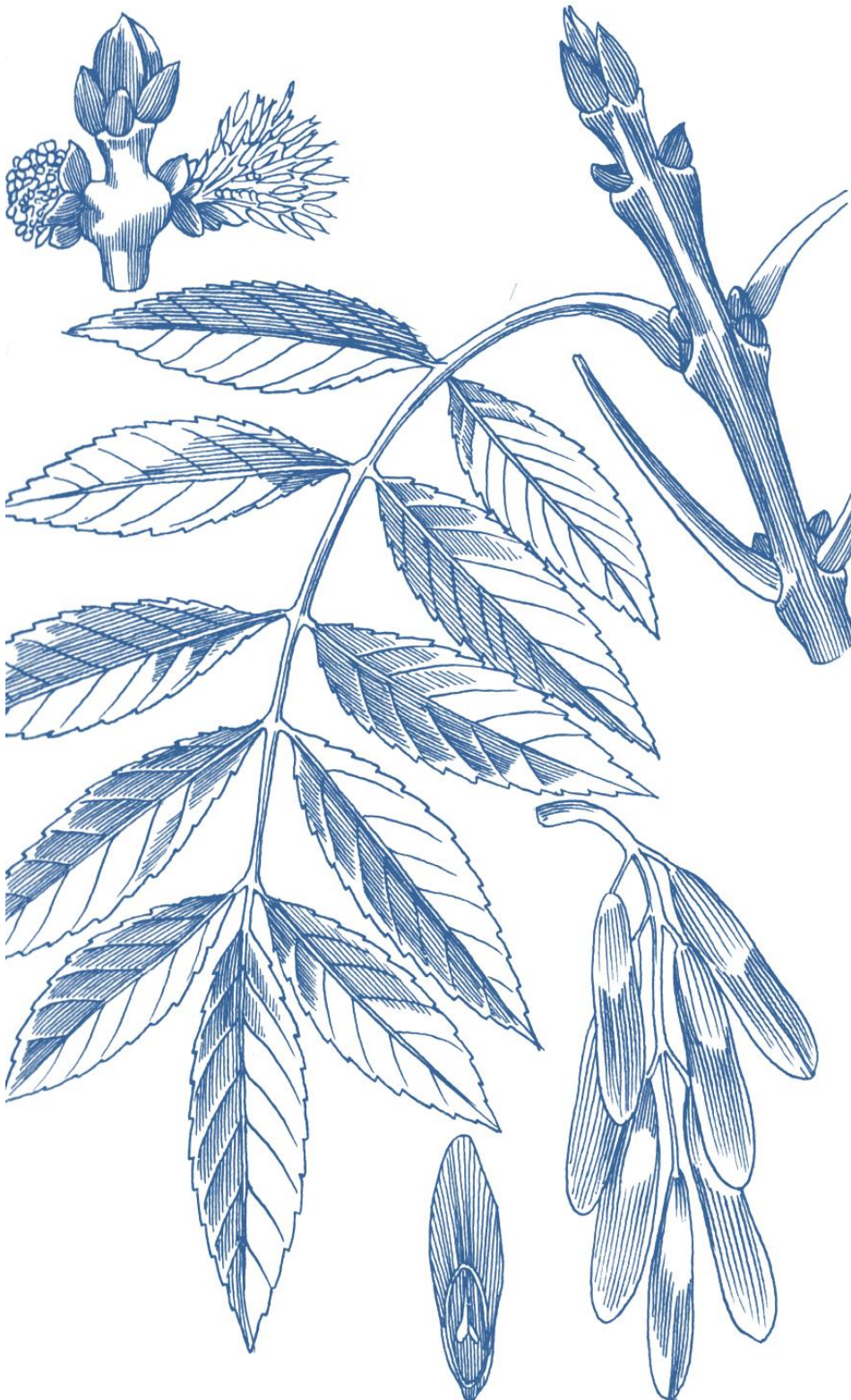


TABLE I. Between- and within-study group changes in measured variables

Variables	Within-group change across visits*				Between-group change across visits (95% CI)†	
	Placebo (95% CI)‡	P value	Mepolizumab (95% CI)‡	P value		P value
Blood eosinophils§	0.77 (0.58-1.03)	.173	4.6 (2.6-7.9)	.001	6.1 (3.9-9.7)	<.001
% Sputum eosinophils§	1.2 (0.6-2.2)	.347	2.2 (0.6-4.3)	.236	1.8 (1.1-3.0)	.032
FENO§	0.95 (0.7-1.2)	.852	0.96 (0.8-1.2)	.781	1.0 (0.8-1.3)	.924
Postbronchodilator FEV ₁ /% predicted	0.92 (−2.1 to 3.9)	.172	−0.99 (−6.9 to 4.9)	.456	−1.9 (−6.0 to 2.2)	.433
Modified JACQ	0.05 (−0.2 to 0.3)	.171	0.59 (0.3-0.9)	.001	0.54 (0.01-1.06)	.047

*Within-group changes presented are the mean change for each variable over a 12-month observation period, from the baseline visit of the observation period (ie, final treatment visit of clinical trial), computed by using a repeated-measures model (see the Online Repository at www.jacionline.org).

†Between-group changes are expressed as the within-group change in the mepolizumab group compared with the within-group change in the placebo group. For variables reporting fold change, comparisons of between-group change are expressed as the ratio of fold change.

‡Former allocation treatment in the blinded study. Subjects were treated with standard of care during the follow-up observation period.

§Changes expressed as fold change. FENO, Fraction of exhaled nitric oxide.

in patients with severe eosinophilic asthma and recurrent exacerbations.

We acknowledge the considerable commitment made by the research volunteers, laboratory support from Debbie Parker, and technical assistance from the lung function staff at Glenfield Hospital.

Pranabashis Haldar, MD^{a,b}
Christopher E. Brightling, PhD^{a,b}
Amisha Singapuri, BSc^a
Beverly Hargadon, BSc^a
Sumit Gupta, PhD^{a,b}
William Monteiro, BSc^a
Peter Bradding, PhD^{a,b}
Ruth H. Green, MD^a
Andrew J. Wardlaw, PhD^{a,b}
Hector Ortega, PhD^c
Ian D. Pavord, DM^d

From ^athe Institute for Lung Health, Glenfield Hospital, Leicester, United Kingdom;

^bthe Department of Infection, Immunity and Inflammation, University of Leicester, Leicester, United Kingdom; ^cthe Respiratory Therapeutic Area Unit, R&D, GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC; and ^dthe Respiratory Medicine Unit, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Old Road Campus, Headington, Oxford, United Kingdom. E-mail: ian.pavord@ndm.ox.ac.uk.

This study was supported by the National Institute for Health Research (NIHR) Leicester Respiratory Biomedical Research Unit. The views expressed are those of the authors and not necessarily those of the UK National Health Service, the NIHR, or the Department of Health.

Disclosure of potential conflict of interest: C. E. Brightling has received research support from the University of Leicester and has received grants and consultancy fees paid to his institution from GlaxoSmithKline, MedImmune/AstraZeneca, Novartis, Chiesi, and Roche/Genentech. P. Bradding received mepolizumab free of charge for this study from GlaxoSmithKline and has received travel support and honoraria for lectures from GlaxoSmithKline. R. H. Green has received personal fees for honoraria, royalties, or fees for consulting, lectures, speakers' bureaus, expert testimony, employment, or other affiliations from Boehringer Ingelheim, AstraZeneca, and Novartis. A. J. Wardlaw has received research support and honoraria for advisory boards from GlaxoSmithKline; is a member of a data safety monitoring board for TEVA; and has received research support from Pfizer. H. Ortega is employed by and owns stocks in GlaxoSmithKline. I. D. Pavord has received research and travel support from and has consultant arrangements with GlaxoSmithKline; has board memberships with Almirall, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, 220 GlaxoSmithKline, MSD, Schering-Plough, Novartis, Dey, and Napp; has consultant arrangements with Almirall, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, 220 GlaxoSmithKline, MSD, Schering-Plough, Novartis, Dey, and Napp; and has received payment for lectures from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, GlaxoSmithKline, Boston Scientific, and Aerocrine. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

1. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009;360:973-84.

2. Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2012;380:651-9.
3. Kim YJ, Prussin C, Martin B, Law MA, Haverly TP, Nutman TB, et al. Rebound eosinophilia after treatment of hypereosinophilic syndrome and eosinophilic gastroenteritis with monoclonal anti-IL-5 antibody SCH55700. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:1449-55.
4. Stein ML, Villanueva JM, Buckmeier BK, Yamada Y, Filipovich AH, Assa'ad AH, et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy reduces eosinophil activation ex vivo and increases IL-5 and IL-5 receptor levels. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1473-83, 1483.
5. Jatakanon A, Lim S, Barnes PJ. Changes in sputum eosinophils predict loss of asthma control. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:64-72.
6. Deykin A, Lazarus SC, Fahy JV, Wechsler ME, Boushey HA, Chinchilli VM, et al. Sputum eosinophil counts predict asthma control after discontinuation of inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:720-7.
7. Leuppi JD, Salome CM, Jenkins CR, Anderson SD, Xuan W, Marks GB, et al. Predictive markers of asthma exacerbation during stepwise dose reduction of inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:406-12.
8. Pizzichini MM, Pizzichini E, Clelland L, Efthimiadis A, Pavord I, Dolovich J, et al. Prednisone-dependent asthma: inflammatory indices in induced sputum. *Eur Respir J* 1999;13:15-21.

Available online January 10, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.026>

Ash pollen immunoproteomics: Identification, immunologic characterization, and sequencing of 6 new allergens

To the Editor:

Ash (*Fraxinus excelsior*) is widely distributed in Northern and Central Europe. Although yearly ash pollen counts are in the range of 1000 grains/m³, their clinical relevance has been undervalued because ash pollination overlaps with that of Betulaceae.¹ Subsequently, ash has not been included in diagnostic assays,² although it is responsible for extensive pollinosis in Alsace (France) and Austria where ash pollination occurs after birch,² and in Switzerland where it is as frequent as birch pollinosis.³

Allergic patients are commonly diagnosed and treated with protein extracts from natural sources. An alternative approach for allergy diagnosis and personalized treatment of patients consists of the use of purified allergens. For this purpose, it is necessary to know the near complete allergogram of the source responsible for the sensitization.

Despite the complexity of the IgE-reactive protein profile observed by 1D-electrophoresis (1DE) analysis of *F excelsior* pollen,^{4,5} Fra e 1 is the only ash pollen allergen isolated, produced as recombinant protein, that has been characterized.⁴ We therefore performed an extensive 2D-electrophoresis (2DE)

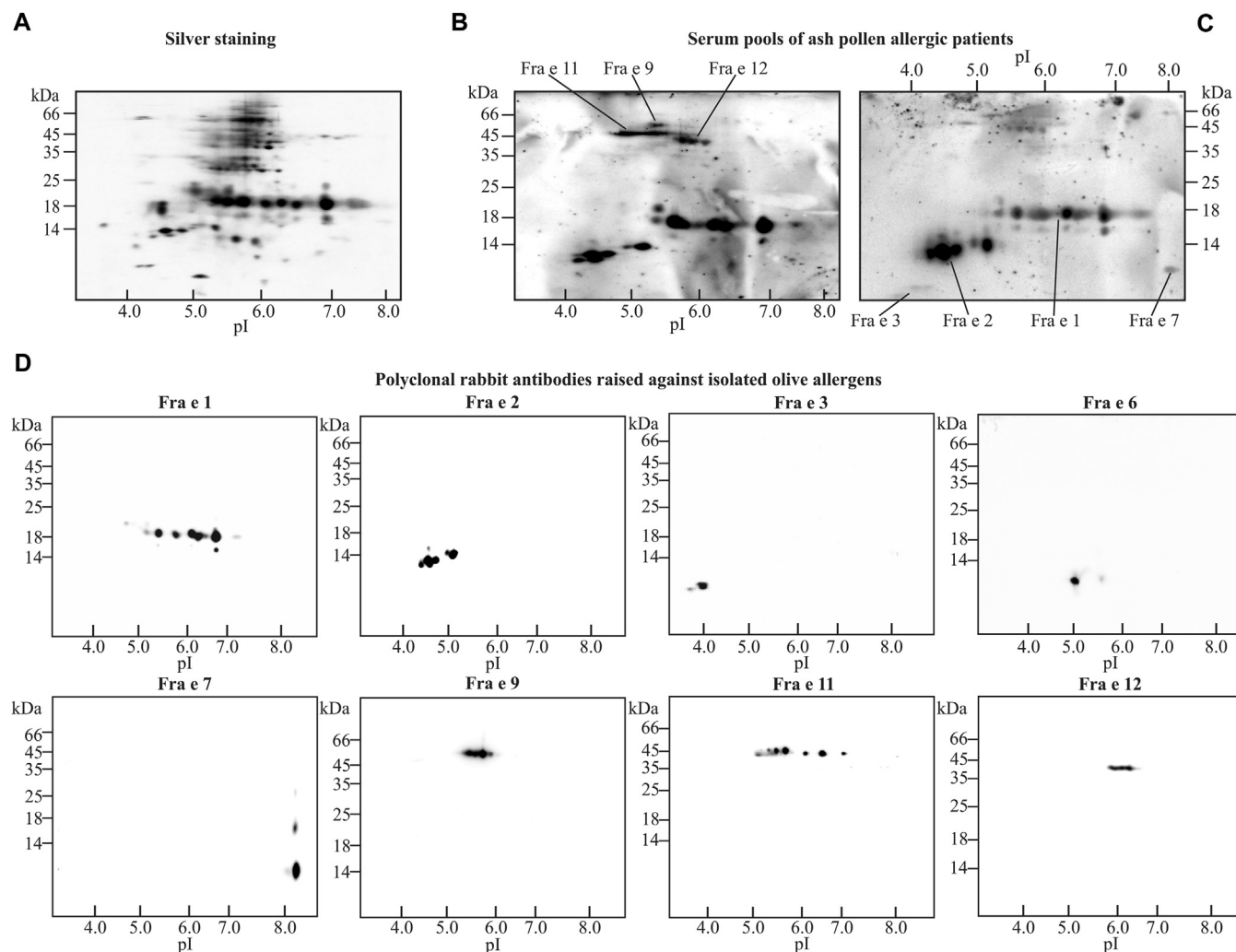


FIG 1. IgE-reactive proteins identified by immunoproteomic profiling of ash pollen extract. **A**, 2DE separation of ash pollen extract followed by silver staining. IgE-immunoblot after 2DE using 15% (**B**) or 17% (**C**) polyacrylamide gels. IgE immunostaining was performed with a selected equivolumetric pool of 8 sera directed against high-MW allergens (Fig 1, **B**) or 8 sera directed against low-MW allergens (Fig 1, **C**).^{4,5} **D**, 2DE as in **B** and **C**, and immunostaining with the indicated polyclonal antisera raised against known olive pollen allergens to identify the main IgE-reactive components of ash pollen extract. The IgE-reactive spots named in **B** and **C** were identified according to the IgG reactivity in **D**.

analysis to identify the IgE-reactive protein content by using serum of 25 ash pollen-sensitized patients with IgE reactivity to ash and olive pollen extracts as assessed by ELISA (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). On average, silver-stained gels showed 165 ± 15 spots between isoelectric points (pI) 3.5 and 8.2 and molecular weights (MWs) between 4 kDa and 70 kDa (see Fig 1, **A**). To visualize IgE-binding proteins, 2D-immunoblots were performed by using 2 independent pools containing the sera of 8 different ash pollen-allergic patients (see Fig 1, **B** and **C**). We found 35 ± 2 IgE-binding proteins with pIs ranging from 3.8 to 8.1 and MWs ranging between 8 kDa and 66 kDa. A main group of IgE spots centered at mildly acidic-neutral pI and having MWs about 18 to 22 kDa corresponded to Fra e 1 isoforms.^{4,5}

We hypothesized that most of the observed IgE-reactive bands might correspond to proteins with similar molecular features (pI and MW) to previously described olive pollen allergens: Ole

e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 9, Ole e 10, Ole e 11, and Ole e 12.⁶ To address this question, we then performed a complete immunoproteomic study of ash pollen extract by 2DE by using polyclonal antisera raised against the most relevant olive pollen allergens (see Fig 1, **D**). We identified IgG-reactive proteins and named them as Fra e 1, Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra e 11, and Fra e 12, according to the olive homologues recognized by the rabbit antisera. The so identified proteins and their cross-reactive isoforms corresponded to most of the identified IgE-reactive allergens (see Fig 1, **B** and **C**). Fra e 10 was detected only by 1DE (data not shown).

These findings suggest high sequence identity between olive and ash pollen allergens. To confirm this hypothesis, cDNA encoding 6 ash pollen allergens not previously reported (Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 10, Fra e 11, and Fra e 12) was amplified by PCR, cloned, and sequenced (see Table E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).⁴ cDNA encoding the

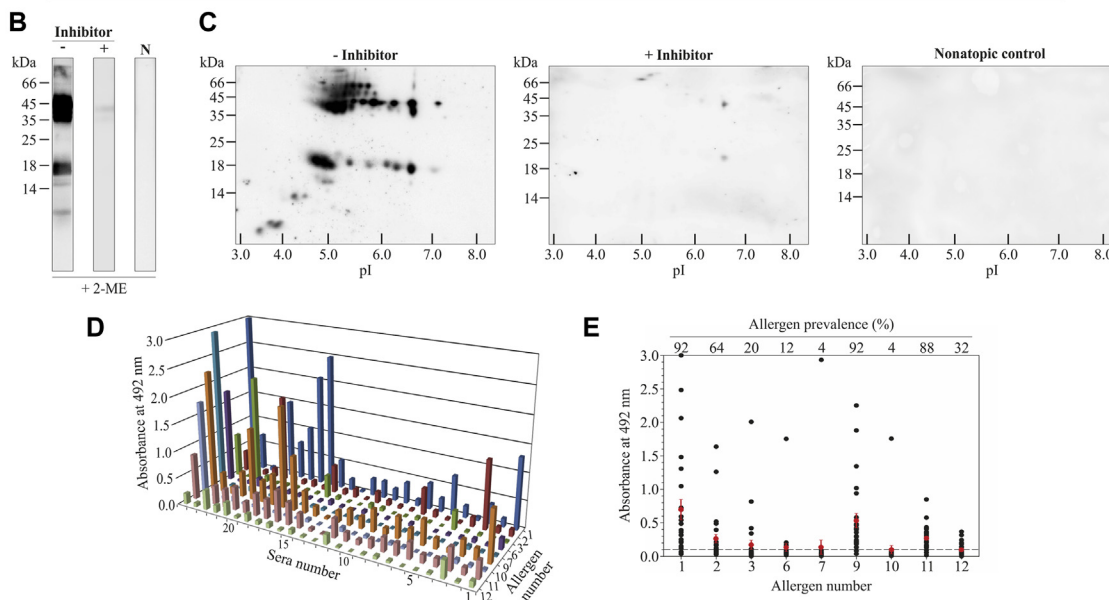
[illegible]

FIG 2. Amino acid sequences of ash allergens and IgE-binding inhibition assays to ash pollen extract and allergenic contribution of ash pollen allergens. **A**, Amino acid sequences of the 6 new allergens from *Fexcelisior* pollen and alignment with their *O europaea* counterparts. *Dots*, Same amino acid than reference. *Dash*, Gaps. Identity and similarity were calculated without the theoretical signal peptide. Accession numbers: Fra e 2 (KC920922), Fra e 3 (KC920923), Fra e 6 (KC920921), Fra e 10 (KC920924), Fra e 11 (KC920915), Fra e 12 (EF626802), Ole e 2 (A4GE44), Ole e 3 (O81092), Ole e 6 (O24172), Ole e 10 (Q84V39), Ole e 11 (D8VPP5), and Ole e 12 (E1U332). **B**, Inhibition of the IgE binding to ash pollen extract subjected to 1DE by using a pool of 8 randomly selected sera different from those used in Fig 1 to avoid any bias toward any particular allergen and a cocktail of 2.5 µg/mL of each of the olive pollen allergens homologous to Fra e 1, Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra 10, Fra e 11, and Fra e 12 as inhibitors. –, No inhibitor; +, with inhibitors; *N*, nonatopic serum. **C**, Inhibition of the IgE binding to ash pollen extract subjected to 2DE by using the same olive allergen cocktail. *Left*, No inhibitor. *Right*, With inhibitors. A nonatopic serum was used as control. **D**, Specific IgE levels for each olive pollen allergen in optical density at 492 nm for the 25 ash pollen-sensitized sera obtained by using ELISA. **E**, Median value (*red dot*) and SD (*red error bars*) are also represented.

complete sequences of 6 of the most IgE-reactive allergens from ash pollen codified for polypeptides ranging from 50 amino acids for Fra e 6 to 341 for Fra e 11 (see Fig 2, A). Ash allergens possessed physicochemical properties similar to those of olive pollen: acidic to mildly acidic proteins (4.3 to 6.5) except Fra e 7 with a basic pI of 8.2, low to medium MWs (5.8–37.4 kDa), and the presence of signal peptides for Fra e 6, Fra e 10, and Fra e 11. The sequence identity between ash and olive pollen allergens ranged from 84% to 97%, and sequence similarity ranged from 94% to 99%, except for Fra e 11, which presented the lowest identity and similarity (79% and 90%, respectively) with its olive counterpart (see Fig 2, A).

Considering the high amino acid sequence identity and similarity between ash and olive pollen allergens, we hypothesized that purified olive pollen allergens could be used to assess the significance, potency, and prevalence of ash pollen allergens. We then performed IgE-inhibition assays of the ash pollen extract with ash-sensitized patients' sera and the panel of purified olive pollen allergens as inhibitors. By densitometry of 1DE and 2DE IgE-inhibition assays, we measured a 95% reduction in the IgE binding obtained with the IgE serum pool without inhibitors (see Fig 2, B and C). The residual IgE-positive signals might be due to the recognition of specific isoforms not so cross-reactive to olive pollen allergens because of differences in their amino acid sequence or glycosylation patterns. Alternatively, the presence of other allergens different from those present in olive pollen should not be discarded. In a recent publication analyzing ash pollen components by proteomics based on 2D and mass spectrometry,⁷ the authors identified Fra e 1, Fra e 2, and Fra e 3 as relevant allergens and β -galactosidase, malate dehydrogenase, and a 4-EF hand Ca-binding protein as minor ash pollen allergens, with the vast majority of major allergen spots unidentified.⁷ Then, the IgE reactivity observed in the IgE-inhibition assays might be associated with these minor allergens.⁷

As IgE-inhibition assays validated the use of purified olive pollen allergens to characterize the IgE immune response of ash pollen-sensitized patients, we tested their IgE-binding ability by using ELISA. The deduced prevalence for the cross-reactive ash allergens ranged between 64% and 92% for the major allergens Fra e 1, Fra e 2, Fra e 9, and Fra e 11 and between 4% and 32% for the minor allergens Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 10, and Fra e 12 (see Fig 2, D and E). These findings are in accordance with previous reports involving related and nonrelated allergenic sources, except for Fra e 10, which was previously described as a major allergen in olive pollen.^{6,8}

Collectively, our findings show that the *Fraxinus excelsior* allergogram responsible for allergy symptoms in ash-sensitized patients is highly similar to that obtained from *Olea europaea*, which supports the high cross-reactivity of patients to both pollens. We suggest that it is possible to use indistinctly purified allergens from ash or olive pollen for diagnosis purposes.

Additional information is available (see this article's **Methods** section and References in the Online Repository at www.jacionline.org).

We thank Sara Abián for her excellent technical support.

Salvador Mas, BSc^a
María Torres, BSc^a
María Garrido-Arandia, BSc^{a,b}
Guillermo Salamanca, PhD^{a,c}

Lourdes Castro, BSc^{a,c}
Patricia Barral, PhD^{a,d}
Ashok Purohit, MD, PhD^e
Gabrielle Pauli, MD, PhD^e
Rosalia Rodríguez, PhD^a
Eva Batanero, PhD^a
Rodrigo Barderas, PhD^a
Mayte Villalba, PhD^a

From the ^aDpto. Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ^bCentro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain; ^cALK-Abelló, Madrid, Spain; ^dThe Peter Gorer Department of Immunobiology, Guy's Hospital, King's College London, London, United Kingdom; and ^eService de Pneumologie, Hôpital Lyauté, Hopitaux Universitaires de Strasbourg, France. E-mail: rbarderas@quim.ucm.es.

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (grant no. SAF2008-04053), the Ministerio de Economía y Competitividad (grant no. SAF2011-26716), and the RIRAAF Network (grant no. RD12/0013/0015 from the ISCIII). M.T., G.S., and L.C. were fellows of the FPI program of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). P.B. was a fellow of the FPU program of the Ministerio de Educación. R.B. is a fellow of the Ramón y Cajal program of the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

Disclosure of potential conflict of interest: M. Torres has been supported by one or more grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Patricia Barral has been supported by one or more grants from Ministerio de Educación (Spain); has received support for travel from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology; and is employed by King's College London, Oxford University, and Cancer Research UK. E. Batanero is employed by Universidad Complutense de Madrid (Spain). R. Barderas has been supported by one or more grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and is employed by Complutense University of Madrid. M. Villalba has been supported by one or more grants from the RIRAAF Network (grant no. RD12/0013/0015). The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

REFERENCES

- Hemmer W, Focke M, Wantke F, Götz M, Jarisch R, Jäger S. Ash (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. *Allergy* 2000;55:923-30.
- Metz-Favre C, Papanikolaou I, Purohit A, Pauli G, de Blay F. The reality of ash pollinosis. *Revue Française D Allergologie* 2010;50:568-73.
- Schmid-Grendelmeier P. Pollen allergy and immunotherapy. *Ther Umsch* 2012;69:239-48.
- Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:351-7.
- Barderas R, Purohit A, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: comparison of the natural and recombinant forms. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:557-63.
- Rodríguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Salamanca G, et al. Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:4-10.
- Poncet P, Senechal H, Clement G, Purohit A, Sutra JP, Desvaux FX, et al. Evaluation of ash pollen sensitization pattern using proteomic approach with individual sera from allergic patients. *Allergy* 2010;65:571-80.
- Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:185-95.

Available online January 11, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.10.061>

METHODS

Pollen protein extracts

Pollens from *Fraxinus excelsior* and *Olea europaea* were obtained from ALK-Abelló (Madrid, Spain). Pollen protein extracts were obtained by saline extraction as described previously.^{E1,E2} Protein extract concentration was determined by using the Lowry method according to established protocols.

Serum samples, allergenic proteins, and antibodies

The Ethical Committee of the Complutense University (Madrid, Spain) approved the protocols used for experimental work with mice and all the methodology related to the use of human sera in the study.

Twenty-five patients from Strasbourg (France) with pollinosis to ash (see Table E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org), a class radioallergosorbent test result ranging from 1 to 6 as determined by using the CAP method (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), positive skin prick test reactions to ash pollen extract, and no migratory background to or from the Mediterranean area were included in this study.^{E1,E2} Furthermore, 1 nonatopic patient was used as a negative control. All patients provided informed consent. Patient's sera were positive to ash and olive pollen extract by ELISA (correlation of 0.93).

Polyclonal antisera against indicated natural purified olive pollen allergens were prepared by immunizing separately New Zealand white rabbits in a 6-week period by weekly injections of the protein (100 µg) in complete Freund adjuvant. A horseradish peroxidase–labeled goat polyclonal antibody against rabbit IgG was obtained from Bio-Rad (Richmond, Calif). A mouse mAb against human IgE was kindly donated by ALK-Abelló. A horseradish peroxidase–labeled rabbit polyclonal antibody against mouse IgG was purchased from Dako (San Just Desvern, Barcelona, Spain).

Allergenic olive proteins were purified according to previously published protocols.^{E3} and their concentration determined by using the micro BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, Ill).

1DE, 2DE, and analytical procedures

SDS-PAGE was alternatively performed in 15% or 17% polyacrylamide gels under reducing conditions in the presence of 5% β-mercaptoethanol according to established protocols. Proteins were stained with Coomassie Blue R-250 (Sigma-Aldrich, Química, Spain). Molecular mass was determined with protein markers MW-SDS-70L (Sigma-Aldrich).

2DE was performed in a PROTEAN IEF Cell using 7 cm length, pH 3 to 10, linear ReadyStrip IPG (Bio-Rad) under reducing conditions in the presence of tributylphosphine, and/or dithiothreitol, and iodoacetamide, followed by 15% or 17% SDS-PAGE. Proteins were visualized after silver staining or alternatively transferred to nitrocellulose membranes for immunostaining with ash pollen-sensitized patient's sera or polyclonal antisera. Experiments were performed in triplicate. Images show a representative image of the experiment.

Immunological assays

Proteins were alternatively transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) after SDS-PAGE or 2DE under reducing conditions. Membranes were incubated with individual or an equivolumetric pool of human sera (diluted 1:10), mouse anti-human IgE mAb (ALK-Abelló) (diluted 1:5000), and rabbit anti-mouse IgG horseradish peroxidase–labeled antibody (Dako) (diluted 1:2500). Alternatively, membranes were incubated with rabbit polyclonal antisera raised against olive pollen allergens (diluted 1:10000) followed by goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase–labeled polyclonal antibody (Bio-Rad) (diluted 1:3000) as previously described.^{E1,E4} For immunoblotting inhibition assays, an equivolumetric pool of 8 sera (diluted 1:10) was preincubated with PBS, or 2.5 µg/mL of each purified allergen as inhibitors.^{E1,E4} Chemiluminescent signal was developed by using ECL-Western blotting reagent (Amersham Biosciences). Immunoblotting inhibition assays were quantified by densitometry by using the Multi Gauge software (Fujifilm, Barcelona, Spain). Percentage of IgE inhibition was calculated considering the IgE-binding signal with the membranes incubated with the IgE serum pool in the absence of inhibitors as 100%.

Indirect ELISA was performed in 96-well plates coated with 0.1 µg of purified proteins or 20 µg of pollen extract per well. Assays were performed by using individual human serum samples, or alternatively, an equivolumetric pool of human sera (n = 5) (diluted 1:10), previously adsorbed with indicated concentrations of inhibitors for the inhibition assays.^{E1,E4} Binding of human IgE or specific polyclonal antisera was detected as described above. Signal was developed with o-phenylenediamine diluted in citrate buffer, stopped with 1 mol/L H₂SO₄, and measured at 492 nm in an iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). ELISA experiments were performed in triplicate, and absorbance values above 0.1 were taken as positives.

Cloning strategy

cDNA from *F. excelsior* pollen was synthesized from total RNA by using the SMART RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences-Clontech, Madrid, Spain) according to the manufacturer instructions and directly used as template in PCR reactions. Amplification of *F. excelsior* pollen allergens by PCR was performed by using degenerate and nondegenerate oligonucleotides (see Table E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org) designed from conserved nucleotide sequences from related (olive) and nonrelated phylogenetically homologues as previously described.^{E5,E6} PCR products were cloned into the pCR2.1 plasmid (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), and DNA from 4 to 6 clones of each construction sequenced by using M13 forward and M13 reverse oligonucleotides.

Statistical analysis, amino acid sequence analysis, alignment and modeling

We used Microsoft Excel 2007 for the analysis of ELISA data sets to calculate mean and standard error of the mean. The presence and location of signal peptide cleavage site in the amino acid sequences of ash pollen allergens was calculated with SignalP 4.1,^{E7} and the theoretical molecular mass of the mature proteins without the signal peptide was calculated with the ProtParam tool.^{E8} Alignment of sequences was made by using the freely available GeneDoc software. 3D structure modeling of the allergens was made by using SWISS-MODEL, the fully automated protein structure homology-modeling server of the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://swissmodel.expasy.org/>).^{E9} Models obtained were represented with Visual Molecular Dynamics.^{E10}

REFERENCES

- E1. Barderas R, Purohit A, Rodriguez R, Pauli G, Villalba M. Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: comparison of the natural and recombinant forms. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;96:557-63.
- E2. Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodriguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:351-7.
- E3. Rodriguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:185-95.
- E4. Barderas R, Villalba M, Rodriguez R, Che A. 1: recombinant expression, purification and correspondence to the natural form. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:284-92.
- E5. Mas S, Barderas R, Colas C, Quiralte J, Rodriguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform—molecular and immunological characterization. *FEBS J* 2012;279:4338-49.
- E6. Rodriguez R, Villalba M, Batanero E, Palomares O, Quiralte J, Salamanca G, et al. Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:4-10.
- E7. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 2011;8:785-6.
- E8. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sánchez JC, Williams KL, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 1999;112:531-52.
- E9. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006;22:195-201.
- E10. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996;14:33-8, 27-8.

TABLE E1. Clinical data of the ash pollen-sensitized patients included in the study

Patient no.	Sex	RAST		Skin test (<i>D + d</i>)/2 (mm)		ELISA (OD at 492 nm)	
		Class	kU/L	Histamine	Ash pollen extract	Ash pollen extract	Olive pollen extract
1	F	3	7.45	4.5	9	0.62	0.92
2	F	2	2.77	5	7	0.17	0.17
3	M	3	7.03	5.5	-	0.11	0.11
4	F	2	2.27	7.5	5	0.23	0.43
5	F	4	17.8	6.5	8.5	0.31	0.37
6	M	3	13	8	8.5	0.14	0.15
7	M	3	11.7	6.5	8.5	0.55	0.69
8	M	3	4.95	5.5	8.5	0.81	1.28
9	M	6	>100	4	5	0.74	1.12
10	F	2	1.42	6.5	7.5	0.24	0.32
11	F	2	3.35	4.5	9	0.33	0.32
12	M	2	1.14	4.5	6.5	0.15	0.12
13	F	3	16.5	4.5	4.5	0.50	0.89
14	F	3	4.95	6	10	0.19	0.24
15	F	2	1.19	6.5	9.5	0.09	0.10
16	M	3	5.26	5.5	8	0.32	0.63
17	F	4	25.4	6.5	10	0.92	1.12
18	F	5	56.9	3.5	7.5	0.43	0.53
19	M	3	7.36	6.5	14	0.24	0.35
20	M	2	2.34	7	-	0.20	0.18
21	F	4	21.7	5	9	0.35	0.62
22	M	2	2.64	6	-	0.41	0.64
23	M	2	0.83	4.5	6.5	0.23	0.18
24	F	3	16.1	6	4.5	0.07	0.06
25	M	4	49.4	6.5	8.5	0.52	0.95

Patients were recruited according to a positive cutaneous test response to ash pollen extract and absence of a migratory background to or from Mediterranean area. Patients' ages ranged between 18 and 63 years (mean, 28.5 y).

F, Female; M, male; -, not done.

TABLE E2. Oligonucleotides used to clone ash pollen allergens by using PCR

Allergen	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'
Fra e 2	ATG TCN TGG CAR RCN TAY GT	TTA RAA NAT YTT NGC NAC RTC YTT
Fra e 3	ATG GCC GAC GAT CCA CAG GAA GT	CTA GAA GAT TTT TGC AAC ATC CTT GAC
Fra e 6	ATG GAC GAG GCC CAG TTT	TTA RTT NGG YTT RAA RTT NGC
Fra e 10	ATG CGA GGA ACC GCA	TCA AGA GAG GAA TGA GCA
Fra e 11	ATG GAT GAT AGA GTA CCT ATT CC	TTA AGC TTT GGC GGG GGG
Fra e 12	ATG GCT GAG AAA ACC AAG ATT TTG	TTA AAC AAA TTG ATT AAG GGA CTC CTC

Bloque II. Estudio del polen de *Fraxinus excelsior* como una fuente alérgica relevante

ARTÍCULO V

Characterization of profilin and polcalcin panallergens from ash pollen



Characterization of profilin and polcalcin panallergens from ash pollen

S Mas^{1*}, M Garrido-Arandia^{1,2*}, E Batanero¹, A Purohit³, G Pauli³,
R Rodríguez¹, R Barderas¹, M Villalba¹

¹Departamento Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA), Campus de Montegancedo, Pozuelo de Alarcón, Madrid

³Service de Pneumologie, Hôpital Lyautey, Hopitaux Universitaires de Strasbourg

*Both authors contributed equally to this work.

■ Abstract

Background: Ash (*Fraxinus excelsior*) is an important source of allergenic pollen in temperate areas of Europe. Profilin and polcalcin are two important panallergens involved in cross-reactivity between different sources.

Objective: To clone and produce as recombinant proteins Fra e 2 (profilin) and Fra e 3 (polcalcin) as well as evaluate their immunological properties using the natural forms obtained from ash pollen.

Methods: Total RNA from ash pollen was used as template to obtain the specific cDNA sequences of the two panallergens. The cDNA-encoding sequences were cloned into the pET11b expression vector and used to transform BL21(DE3) *Escherichia coli* cells. Proteins were expressed, purified by chromatography and characterized by circular dichroism, mass spectrometry and immunologically by western blot and ELISA using profilin and polcalcin polyclonal antibodies and human sera from ash pollen-sensitized patients.

Results: Profilin and polcalcin amino acid sequences from ash pollen showed a high degree of identity with homologous allergens from different sources. The cDNA-encoding allergen sequences were expressed as non-fusion recombinant proteins and purified to homogeneity. Secondary structure values were similar to those obtained from other members of these families. Allergenic properties of the recombinant allergens were observed to be equivalent to those of the natural counterparts from *F. excelsior* pollen.

Conclusions: Fra e 2 and Fra e 3 recombinant allergens might be used in clinical diagnosis to determine profilin and polcalcin specific IgE levels present in the sera of ash pollen-sensitized patients, thus facilitating the finding of the sensitizing source in areas with complex sensitization profiles.

Key words: Ash pollen, Panallergens, Polcalcin, Profilin, Recombinant allergen.

■ Resumen

Antecedentes: El polen de fresno (*Fraxinus excelsior*) es una importante fuente alérgica en zonas cálidas de Europa. La profilina y polcalcina son dos panalérgenos implicados en reactividad cruzada.

Objetivos: Clonar y producir Fra e 2 (profilina) y Fra e 3 (polcalcina) como alérgenos recombinantes. Comparar sus propiedades inmunológicas con sus formas naturales del polen de fresno.

Métodos: El RNA total de polen de fresno se utilizó como molde para obtener los cDNAs específicos de ambos panalérgenos. Dichos cDNAs se clonaron en el vector de expresión pET11b y se transformaron células de *Escherichia coli* BL21(DE3). Las proteínas se caracterizaron mediante dicroísmo circular, espectrometría de masas, inmunodetección en membrana y ELISA utilizando anticuerpos policlonales frente a profilina y polcalcina y sueros de pacientes alérgicos a polen de fresno.

Resultados: Las secuencias de aminoácidos de la profilina y polcalcina de polen de fresno presentaban una identidad de secuencia elevada con alérgenos homólogos. Dichos alérgenos se expresaron como proteínas recombinantes independientes y se purificaron a homogeneidad. Los valores de estructura secundaria fueron similares a los de otros miembros de estas familias. Las propiedades alérgicas de los alérgenos recombinantes resultaron ser equivalentes a los de sus homólogos naturales del polen.

Conclusiones: Los alérgenos recombinantes Fra e 2 y Fra e 3 podrían usarse en diagnóstico clínico para determinar los niveles de IgE específicos para profilina y polcalcina en los sueros de los pacientes sensibilizados a polen de fresno, facilitando así la identificación de la fuente sensibilizante en áreas donde los pacientes presentan perfiles alérgicos complejos.

Palabras clave: Polen de fresno, Panalérgenos, Polcalcina, Profilina, Alérgenos recombinantes.

Introduction

Oleaceae family is composed of about 400 species. From an allergenic point of view, the most representative genus is *Olea* with olive tree (*Olea europaea*) as the second most important allergy inducer pollen in Mediterranean countries and the first one in some large Spanish regions [1-4].

Ash (*Fraxinus excelsior*) is the Oleaceae specie mainly distributed over central-Europe. The widespread use of this tree as a resource to obtain wood has turned ash pollen into an important allergenic source. Furthermore, the high structural similarity observed between members of the Oleaceae family make the study of these pollens good candidates to focus on cross-reactivity processes [5]. So far, the presence of profilin, polcalcin and the member of the Ole e 1-like family (Fra e 1) allergens from *F. excelsior* have been described and the latter has been the unique characterized [5-7].

Profilin and polcalcin are known panallergens involved in cross-reactivity processes. Both allergens are small acidic proteins with molecular masses of 14-15 kDa and 9 kDa, respectively. Profilins are actin-binding proteins involved in the regulation of the polymerization changes in the microtubule cytoskeleton and microfilament dynamics and are also part of different signalling pathways like those of proteins of the Ena/VASP family [8]. On the other hand, polcalcins belong to a two EF-hand Ca^{2+} -binding protein family and are implicated in signalling processes, neuronal exocytosis and in pollen tube growth [9, 10]. Both, profilin and polcalcin have been described as panallergens in several pollen sources as *Betula verrucosa*, *Chenopodium album* or *O. europaea* [7, 9, 11-13], and profilin in foods and latex [14]. Both allergens are highly conserved among species, showing their amino acid sequences high identity with their counterparts of other allergenic sources (between 60-90% in polcalcins and more than 75% in profilins), what explains the high degree of cross-reactivity observed between members of the same family.

Profilin has been reported as a major allergen from pollen and food sources like *C. album* or *Cucumis melo*, respectively [15, 16], and in polysensitized populations to olive [13] or grass [17] pollens. Polcalcins have been usually described as minor allergens in most of the analyzed sources but still recruiting a high percentage of specific IgE, ranging from 10 to 40% in allergic patients.

Out of their designation as major or minor allergens, both proteins are important markers of polysensitization, and at least in the case of profilins, a previous sensitization to aeroallergens from pollens causes a later challenge to their counterparts present in some foods with the consequent triggering of an oral allergy syndrome [18]. Indeed, sensitization to latex profilin has been reported to occur through primary sensitization to pollen or food allergens [19]. Polcalcins are involved in processes occurring during pollen germination. Indeed, they have been only described in pollen grains, and accordingly they have not been associated to pollen-food cross-reactivity [20].

In this work we described the recombinant expression and characterization of these panallergens from ash pollen that would facilitate their standardization in the extracts, improve the component-resolved diagnosis of allergy to pollens from the Oleaceae family [21], and also might help to simplify and design the correct treatment of the polysensitized patients. This is particularly relevant in areas where a complex level of exposure to different pollens takes place as a result of the overlap of different allergenic sources, which hampers the diagnosis of these patients [17, 22].

Methods

Plasmids and cells

TOPO-TA Cloning kit (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) was used to obtain partial and full cDNA-encoding sequences of Fra e 2 and Fra e 3 according to the manufacturer instructions. cDNA sequences were subcloned into the pET11b plasmid (Novagen, Billerica, MA, USA) and used to transform *E. coli* DH5 α F' cells (Invitrogen). Expression of recombinant proteins was performed in BL21(DE3) cells (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA).

Protein food and pollen extracts

Pollens from indicated species were purchased from Allergon (Ängelholm, Sweden). Protein pollen extracts were obtained by saline extraction as described previously [23]. Indicated nuts and fruit protein extracts were obtained as previously described [24].

Sera and antibodies

Twenty-five sensitized patients to ash pollen from Strasbourg (France) with demonstrated pollinosis to ash

pollen by prick test, specific IgE to ash pollen extract between class 1 and 6 as determined by the CAP-RAST method (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), no migratory background to or from Mediterranean areas and, then, with ash pollen as primary Oleaceae sensitizer, were recruited for the study after attendance to the Service de Pneumologie of the Hôpital Lyautey (Hôpitaux Universitaires de Strasbourg). This patient population randomly selected was positive to Fra e 1 at the same extent than previously published results [7, 25], being representative of ash pollinosis with no bias to any specific allergen. All patients and the non-atopic control gave written informed consent. The Ethical Committee of the Complutense University (Madrid, Spain) approved the protocols used for experimental work with mice and all the methodology related to the use of human sera in the study as the Ethical Committee from the Hôpital Lyautey (Strasbourg, France).

Rabbit polyclonal antisera against profilin Ole e 2 (Ole e 2 pAb) or polcalcin Ole e 3 (Ole e 3 pAb) from *O. europaea* pollen were obtained by weekly injections (100 µg) of the allergen in complete Freund's adjuvant. The production of these antibodies was supervised by the animal facility of the Fundación Jiménez Díaz (Madrid, Spain) to ensure that the experiments were performed in accordance to Spanish legislation and the guidelines of Ethical Committee of the Fundación Jiménez Díaz and Complutense University of Madrid. Horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit polyclonal IgG was obtained from Bio-Rad (Richmond, CA, USA). Mouse monoclonal IgG against human IgE was kindly donated by ALK-Abelló. Horseradish peroxidase-labelled goat polyclonal IgG against mouse Ig was purchased from Pierce Chemical Co (Rockford, IL, USA). Horseradish peroxidase-labeled rabbit polyclonal IgG against mouse Ig was from Dako (Sant Just Desvern, Barcelona, Spain).

Cloning and recombinant expression of Fra e 2 and Fra e 3

Total RNA from ash pollen was isolated as described [6] and used as template to obtain the cDNA by reverse transcription according to the instructions of the SMART RACE cDNA amplification kit (BD Biosciences/Clontech, Madrid, Spain). Amplification of Fra e 2 and Fra e 3 specific sequences was performed using degenerate oligonucleotides spanning the different sequences of previously described profilin and polcalcin

allergens and an unspecific primer (UPM) included in the kit.

Two steps were followed to clone both proteins. A first PCR round was performed with the UPM primer and degenerate oligonucleotides 5'-atacatATGTCNTGGCARRCNTAYGT-3', codifying for MSWS/AYV for Fra e 2 with a *NdeI* restriction site underlined, and 5'-atgaattcTTARAANATYTTINGCNACRTCYYT-3' codifying for KDVAK I/M F for Fra e 3 with an *EcoRI* restriction site underlined. Then, the cDNA of Fra e 2 was cloned in a second round of PCR using the same degenerate sense primer and the antisense oligonucleotide 5'-CTCATTGANCAGGGCCTGTAGCTCGAGTCC-3' codifying for LIDQGL, whose sequence was obtained from the sequencing of the first PCR round. For Fra e 3, the second round of PCR was performed using the previously obtained cDNA and the specific sense 5'-atacatATGGCCGACGATCCACAGGAAGT-3' with a *NdeI* restriction site underlined (MADDPQE), and the antisense 5'-aaagaattctaGAAGATTTTGCAACATCCTTGAC-3' (VKDVAKIF) (with a *EcoRI* restriction site underlined) primers, deduced from the previously obtained cDNA sequence. Both cDNA sequences were cloned into the PCR2.1 (Invitrogen), and then digested with *NdeI* and *EcoRI* and subcloned into the pET11b plasmid (pET11b/Frae2.1 and pET11b/Frae3). *E. coli* DH5α F' cells were transformed to expand these plasmids. Afterwards, the recombinant constructs were used to transform *E. coli* BL21(DE3) cells to express the allergens as recombinant proteins.

E. coli BL21(DE3) transformed cells were induced with 0.4 mM isopropyl-β-thiogalactoside at 37 °C for 4 h. Then, cells were centrifuged at 6000 g during 20 min at 4 °C. Cell pellets were resuspended in 20 mM ammonium bicarbonate (AB) containing phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM and lysed by three cycles of freezing in liquid N₂ and thawing at 42 °C. Debris was removed after centrifugation at 12000 g during 20 min at 4 °C and the supernatant containing the recombinant proteins collected and lyophilized.

Purification of rFra e 2 and rFra e 3

The first step of the purification of Fra e 2 and Fra e 3 was the same; a size-exclusion chromatography in a Sephadex G-50 medium column (39 x 5.75 cm) equilibrated in 0.2 M AB pH 8.0.

Regarding Fra e 3 purification, fractions containing the recombinant protein were loaded onto a DEAE-cellulose column and eluted with an ionic strength gradient ranging from 0.1 to 0.5 M AB pH 8.0. Finally, both recombinant proteins were separately purified to homogeneity by a final step using reverse-phase HPLC in a Nucleosil C18 column with an acetonitrile gradient in 0.1% trifluoroacetic acid.

Protein purification of Fra e 2 and Fra e 3 through all chromatographic steps was visualized by 17% SDS-PAGE in the absence of 2-mercapthoethanol according to standard procedures.

Structural characterization and sequence analysis predictions

Purified recombinant proteins were lyophilized and reconstituted in 50 mM sodium phosphate pH 7.5 at a concentration of 200 µg/ml to record the CD spectra in the far-UV on a JASCO J-715 spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan). CDNN CD spectra deconvolution software (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) was used to obtain the composition in secondary structure of the CD spectra. Mass spectrometry was achieved to obtain the experimental molecular mass in a Bruker Reflex IV MALDI-TOF apparatus (Bruker-Franzer Analytic, Bremen, Germany). The theoretical molecular masses according to the sequences obtained by cloning were processed with the ProtParam Tool [26].

The homology of the polcalcin and profilin sequences obtained were analyzed with the Basic Local Alignment Search Tool of The National Center for Biotechnology Information [27] and sequences aligned using the GeneDoc software (<http://www.nrbsc.org/>). Modeling of 3D structure of Fra e 2 and Fra e 3 was accomplished using the homology-modeling server of the Swiss Institute of Bioinformatics [28] using as templates Bet v 2 (PDB: 1cqa) for profilin [29] and Che a 3 (PDB: 2opo) for polcalcin [30].

Immunological characterization

After SDS-PAGE, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) and immunostained with Ole e 2 pAb or Ole e 3 pAb (diluted 1:10000 or 1:5000, respectively) or individual human sera from ash pollen-sensitized patients or a non-atopic control (diluted 1:10) followed by a mouse monoclonal Ig against human IgE. Then,

membranes were incubated with previously described peroxidase-labelled secondary antibodies. For the immunoblotting inhibition assays, Ole e 2 pAb, Ole e 3 pAb or a pool of sera (n=5) were pre-incubated with PBS, and 1 or 5 µg of purified proteins as inhibitors. Finally, chemiluminiscent signal was developed by the ECL western blotting reagent (Amersham Biosciences).

Indirect ELISA was performed in triplicate in 96-well plates coated with 0.1 µg of purified recombinant protein. Assays were performed using individual human sera (diluted 1:10), a pool of five human sera (diluted 1:10), Ole e 2 pAb or Ole e 3 pAb (diluted 1:10000 and 1:5000 respectively), previously adsorbed to 20 or 200 µg of various protein extracts as inhibitors. Binding of human IgE was detected by mouse monoclonal Ig against human IgE (diluted 1:5000) followed by horseradish peroxidase-labeled goat Ig against mouse IgG (diluted 1:2500). The signal was measured at 492 nm in an iMark microplate absorbance reader (Bio-Rad) after color production with the peroxidase substrate o-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Mean absorbance values above 0.1 were taken as positive, and the percentage of inhibition was calculated according to the formula: inhibition (%) = $[1 - (\text{absorbance at 492 nm with inhibitor} / \text{absorbance at 492 nm without inhibitor})] \times 100$.

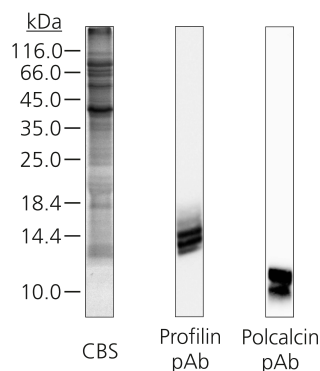


Figure 1. Identification of natural profilin and polcalcin proteins in the *F. excelsior* pollen protein extract using polyclonal antisera raised against olive pollen profilin or polcalcin allergens. 50 µg of total protein extract were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue (CBS) or alternatively transferred to nitrocellulose membranes. Molecular weight markers are shown.

Results

Cloning, recombinant production and purification of ash profilin and polcalcin

Natural profilin and polcalcin were detected by immunoblotting of ash pollen protein extract with profilin or polcalcin specific polyclonal antisera (Figure 1). Both proteins appeared as a group of multiple bands

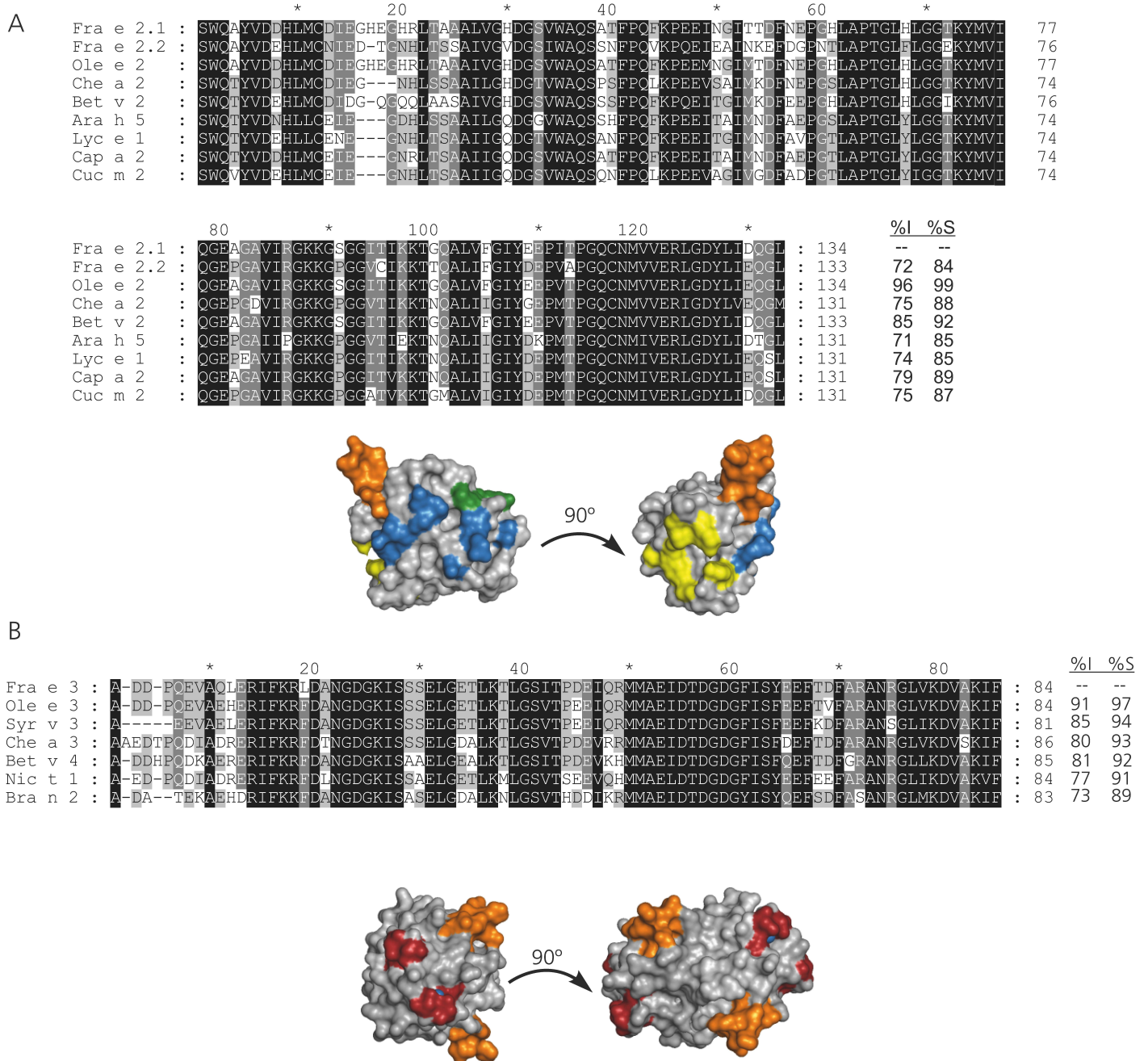


Figure 2. Comparison of the amino acid sequences of profilin and polcalcin from related and non-related allergenic sources. A, Top: Alignment of amino acid sequences of Fra e 2 isoforms with pollen and food profilins; bottom: 3D-modeling of Fra e 2. In orange, highly variable region; blue, actin-binding site; green, IP3-binding site and yellow, poly-L-proline-binding site. B, Top: alignment of Fra e 3 amino acid sequence with pollen polcalcins; bottom: 3D-modeling of Fra e 3 (dimer). In orange, highly variable region; red, calcium-binding site and blue, calcium ion. Percentages of identity and similarity are shown regarding in each case comparing with Fra e 2.1 (Accession number KC920922) and Fra e 3 (KC920923), respectively.

of approximately 14 kDa for profilin and a 10 kDa band for polcalcin.

cDNA sequences of *F. excelsior* profilin and polcalcin were obtained by PCR as described in the Methods section. After cloning and sequencing, two different DNA sequences for Fra e 2 and three for Fra e 3 were obtained (Figure 2A, B). Fra e 2.1 and 2.2 were composed of 402 and 399 nucleotides (134 and 133 amino acids), respectively, whereas the three polcalcin isoforms were composed of 252 nucleotides (84 amino

acids). Fra e 2.1 showed a high identity with plant related profilins, whereas Fra e 2.2 was identical to that previously described for Amaranthaceae profilin [31]. Accordingly, Fra e 2.1 was selected for recombinant expression. For Fra e 3, the three DNA sequences obtained showed 6 silenced nucleotide changes with no modifications in their amino acid sequences. Consequently, the unique deduced amino acid sequence from the three isoforms is shown in figure 2B. Fra e 2.1 showed high identity (96%) and similarity (99%) values with Ole e 2, and values ranging from 71 to 85% and 85

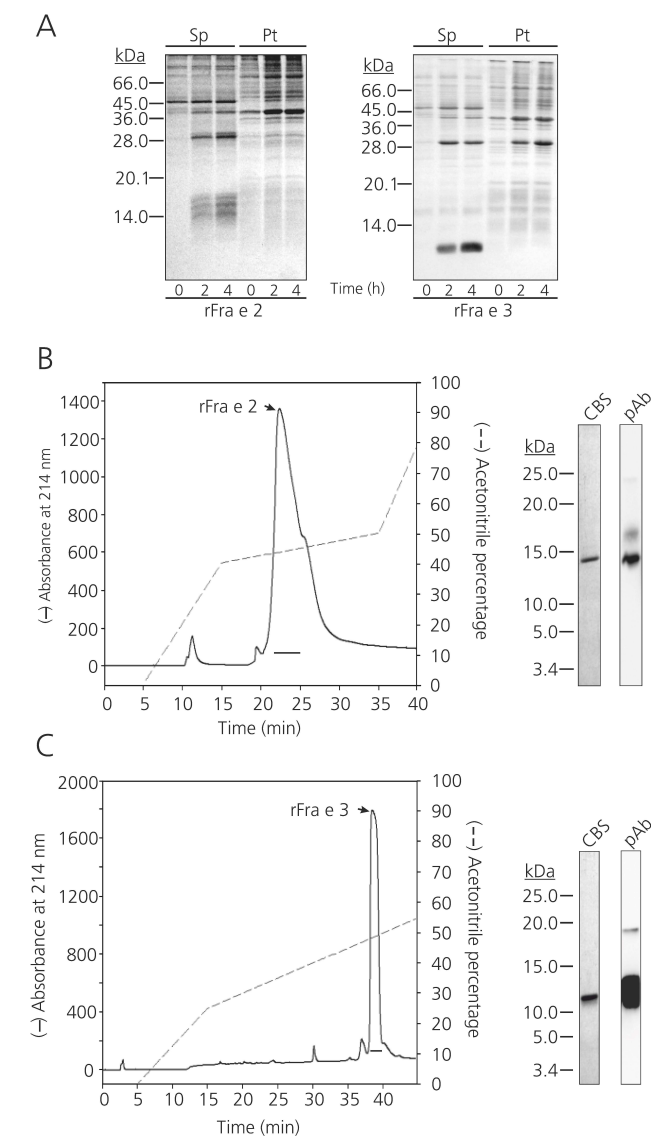


Figure 3. Recombinant production and purification of Fra e 2 and Fra e 3. A, 17% SDS-PAGE stained with Coomassie Blue of supernatant (Sp) and pellet (Pt) obtained after cell lysis at different times of induction. B, last step of purification consisted of a reversed-phase HPLC chromatography with an acetonitrile gradient for rFra e 2 and C, rFra e 3. The line in each chromatogram highlights the fractions pooled for each protein. Pooled fractions containing the recombinant proteins purified at homogeneity (0.5 μ g) were run in 17% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue staining (CBS) or alternatively transferred to nitrocellulose membranes and immunostained with the corresponding pAb (right panel). Molecular weight markers are shown.

to 92%, respectively, with allergenic profilins from other sources, even when comparing pollen profilin from non-related families like *C. album* or *B. verrucosa*, or foods like *Arachis hypogea*, *Capsicum annuum* or *Lycopersicon esculentum* (Figure 2A). Analogous values of identity and similarity were observed between Fra e 3 and polcalcins from related species like *O. europaea* (91/97%) and *Syringa vulgaris* (85/94%) or pollen polcalcin from non-related families like *B. verrucosa*, *C. album*, *Brassica napus* or *Nicotiana tabacum* with percentages of identity and similarity ranging from 61 to 81% and 82 to 92%, respectively (Figure 2B).

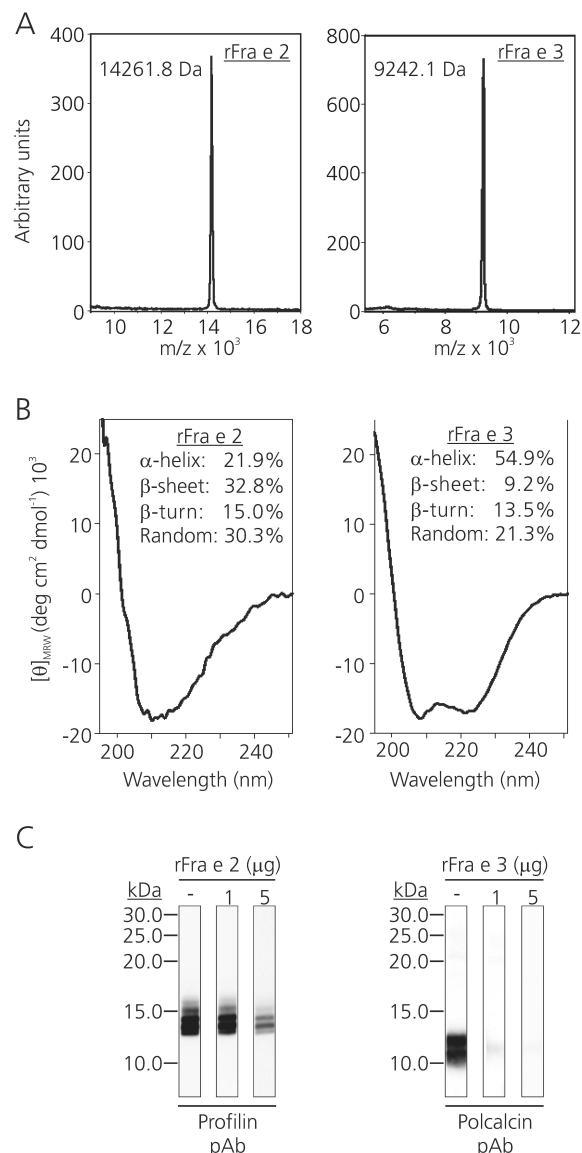


Figure 4. Molecular and immunological characterization of rFra e 2 and rFra e 3. A, Mass spectrometry in arbitrary units. B, CD spectra and percentages of secondary structure obtained by deconvolution. C, IgG-binding inhibition assays by immunoblotting with the corresponding polyclonal antisera raised against olive pollen profilin or polcalcin to 50 μ g of total ash pollen protein extract using 1 or 5 μ g of the recombinant purified proteins as inhibitors. (-), without inhibitor. Molecular weight markers are shown.

The selected cDNA-encoding sequences were cloned into the pET11b plasmid and used to transform BL21(DE3) *E. coli* cells for recombinant expression of the proteins. The production of the recombinant allergen was visualized by SDS-PAGE. Fra e 2 and Fra e 3 were observed in the soluble fraction after bacterial lysis with the highest yield at 4 h of induction at 37 °C (Figure 3A). Two chromatographic steps for rFra e 2 and three for rFra e 3 were necessary to purify these proteins. Although proteins seemed to be homogeneous by the SDS-PAGE, a final chromatographic step consisted in both cases of a reverse-phase HPLC with an acetonitrile gradient was performed to remove subtle amounts of

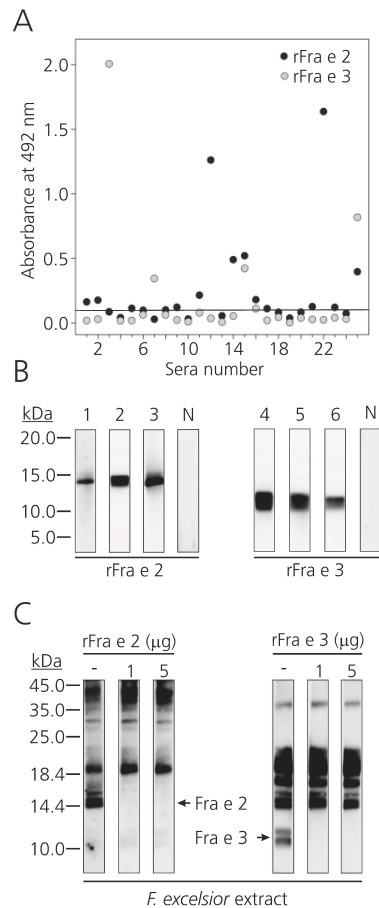


Figure 5. IgE-binding ability of rFra e 2 and rFra e 3. A, Determination of IgE binding from individual sera by ELISA. The horizontal line indicates the 0.1 cut-off value where sera values were considered positive. B, Immunoblotting of 0.5 µg of the recombinant proteins using individual sera from allergic patients to *F. excelsior* and a non-atopic serum (N). C, Inhibition of the IgE binding to the natural Fra e 2 and Fra e 3 from the pollen protein extract of *F. excelsior* using 1 or 5 µg of rFra e 2 and rFra e 3 as inhibitors. (-), no inhibitor. Arrows indicate the electrophoretic mobility of natural Fra e 2 and Fra e 3. Molecular weight markers are shown.

contaminants (Figure 3B, C). This procedure rendered about 10 mg of recombinant protein by liter of cell culture in both cases.

Molecular characterization of Fra e 2 and Fra e 3

Experimental molecular masses of rFra e 2 and rFra e 3 obtained by mass spectrometry were 14261.8 and 9242.1 Da, respectively (Figure 4A). These values differed from their theoretical molecular masses in 117.4 and 87.3 Da respectively, probably due to the processing of the N-terminal methionine by the bacterial machinery in both recombinant proteins.

CD spectra revealed a correct-folding of the two proteins with a higher content in β -sheet for rFra e 2 and α -helix for rFra e 3 in comparison to previously reported values of secondary structure from counterparts resolved crystals (Figure 4B) [29, 30].

Antigenic validation of the recombinant proteins was accomplished by IgG immunoblotting inhibition experiments using natural profilin and polcalcin contained in the pollen protein extract (Figure 4C). A total inhibition to natural polcalcin was observed for rFra e 3 and 85% of inhibition to natural profilin for rFra e 2 using in both cases 5 µg of each recombinant protein as inhibitor. These results pointed out to their equivalency with the natural forms present in the pollen.

The IgE binding to both recombinant proteins was tested by ELISA using sera from 25 randomly obtained ash pollen-sensitized patients from Strasbourg (Figure 5A) [7, 25]. According to the selection criteria, this patient's cohort should be representative of ash pollinosis, with no bias towards any specific allergen sensitization. This study revealed that 52% and 16% of the sensitized patients possessed specific IgEs to rFra e 2 and rFra e 3, respectively. The median values obtained for the 15 sera reactive to rFra e 2 and the 4 to rFra e 3 were 0.175 and 0.619, respectively.

Three individual sera and a non-atopic control were tested by immunoblotting using rFra e 2 and rFra e 3 (Figure 5B), showing the specific IgE binding to the recombinant proteins. The validation of rFra e 2 and rFra e 3 against their natural counterparts was confirmed by immunoblotting inhibition assays of ash pollen extract using a pool of sera from allergic patients to each allergen and the recombinant proteins as inhibitors (Figure 5C). A complete inhibition of the IgE binding to the natural profilin and polcalcin present in the *F. excelsior* pollen protein extract was observed using the recombinant forms.

Finally, IgE cross-reactivity of ash pollen profilin and polcalcin was tested by ELISA inhibition experiments using a pool of sera from ash pollen-sensitized patients and pollen and plant-derived food extracts (200 µg) as inhibitors (Table 1). The protein integrity of polcalcin in pollen and profilin in pollen and plant-derived food extracts was tested prior to be used in subsequent experiments (data not shown). For ash pollen profilin, inhibition levels were observed to range between 50 to 70% except for tomato, peanut and mugwort extracts, whose values were lower than 20%. Small differences in inhibition levels to ash pollen profilin were observed between pollen (mean inhibition in percentage \pm SD was 69 ± 15) and plant-derived food (58 ± 17) extracts used as inhibitors.

Table 1. IgE cross reactivity with a pool of sera from allergic patients to profilin (Fra e 2) and polcalcin (Fra e 3).

Extract name	Percentage of inhibition ^a				Accession number and (identity and similarity in %)	
	rFra e 2-Coated wells		rFra e 3-Coated wells			
	20 µg	200 µg	20 µg	200 µg	Profilin	Polcalcin
<i>Sinapis alba</i> (Mustard)	58	59	-	-	ABU95412.1 (80/89)	-
<i>Prunus persica</i> (Peach)	9	56	-	-	Q8GT40 (80/91)	-
<i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	66	66	-	-	-	-
<i>Persea americana</i> (Avocado)	66	67	-	-	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomato)	2	5	-	-	Q93YG7 (74/85)	-
<i>Capsicum annuum</i> (Pepper)	58	61	-	-	Q93Y19 (79/89)	-
<i>Brassica oleracea</i> (Cauliflower)	54	59	-	-	-	-
<i>Cucumis melo</i> (Melon)	63	63	-	-	Q5FX67 (75/87)	-
<i>Pistacia vera</i> (Pistachio)	32	63	-	-	-	-
<i>Juglans regia</i> (Walnut)	45	64	-	-	-	-
<i>Prunus dulcis</i> (Almond)	48	63	-	-	Q8GSL5 (79/90)	-
<i>Arachis hypogea</i> (Peanut)	1	12	-	-	Q9SQ19 (71/85)	-
<i>Robinia pseudoacacia</i> (Black locust)	61	67	54	69	-	-
<i>Fraxinus excelsior</i> (Ash)	58	72	83	85	-	-
<i>Ligustrum vulgare</i> (Common privet)	41	48	74	85	-	-
<i>Olea europaea</i> (Olive)	66	67	71	81	ABC47412.1 (96/99)	O81092 (91/97)
<i>Betula verrucosa</i> (Birch)	69	69	37	52	P25816 (85/92)	Q39419 (81/92)
<i>Lolium perenne</i> (Perennial ryegrass)	64	66	61	61	-	-
<i>Platanus acerifolia</i> (Planetree)	61	62	52	85	-	-
<i>Salsola kali</i> (Russian thistle)	41	52	45	57	C6JWH0 (76/88)	-
<i>Chenopodium album</i> (Lamb's quarter)	40	52	50	56	Q84V37 (75/88)	Q84V36 (80/93)
<i>Artemisia vulgaris</i> (Mugwort)	1	19	18	38	Q8H2C9 (76/88)	A0PJ17 (61/82)
<i>Parietaria judaica</i> (Pellitory)	36	55	56	62	Q9XG85 (76/88)	B5QST3 (73/85)
<i>Brassica napus</i> (Rapeseed)	57	61	52	60	-	-

^a IgE-binding inhibition (%) to rFra e 2- or rFra e 3-coated wells by using 20 or 200 µg (total protein) of indicated extracts as inhibitors. Inhibition results with ash pollen extract are highlighted in bold. Accession numbers and identity (%) and similarity (%) of the sequence profilin and polcalcin are indicated.

For ash pollen polcalcin, IgE-inhibition values were observed between 50 to 85%, with 38% of inhibition as the lowest value reached by mugwort.

Discussion

Ash tree is a main source of allergenic pollen in temperate areas of Europe. In these regions, allergy to ash pollen has largely been unnoticed because of the overlapping of the flowering periods with *B. verrucosa* [4], with ash pollination naturally preceding birch pollination [32]. Thus, the diagnosis of both birch and ash-sensitized patients and, in general, polysensitized patients is quite complex and very often unsolved. Panallergens are families of ubiquitous proteins with close structural similarities involved in cross-reactivities processes. These allergenic molecules are responsible for most of the diagnostic errors in allergic patients. Although the relevance of some of them such as profilins as inducer molecules of allergic symptoms needs to be further evaluated, they constitute important tools in allergy diagnosis due to the cross-reactivity reactions in which these proteins are involved. The IgE reactivity to profilin is associated with multiple pollen sensitizations and with several pollen-food syndromes [33]. Moreover, polcalcin-allergenic relevance has been exclusively associated to multiple pollen sensitizations,

without any relationship to food allergies since it is a pollen-specific protein [34].

Furthermore, it has been previously described that panallergens from different sources do not present a complete immunological equivalence [34]. In this sense, although the diagnosis of sensitized patients might be performed with any member of the family, the specific immunotherapy of patients would be benefitted of using the specific allergen against which the patient was genuinely sensitized [34, 35]. Moreover, immunotherapy is not only a matter of antibodies but also of T lymphocytes that give very distinct T-cell and antibody isotype responses with minimal amino acid differences in allergen isoforms. Then, the identification, cloning and production of allergen isoforms from different allergenic sources are mandatory for its use in personalized desensitization protocols.

The here studied panallergens -profilin and polcalcin- are involved in cross-reactivity processes between different sources because they are highly conserved proteins. In this sense, panallergens enhance the allergenic character of different sources and also increase the unexpected challenge (burst) of symptoms in certain geographical localizations where high amounts of other pollens are present. For example, the

sensitization to Fra e 2 and Fra e 3 through *F. excelsior* pollen in the population living in the north and middle Europe elicits allergenic reactions when these patients are exposed to *O. europaea* pollen, which is mainly distributed in Southern Mediterranean Europe areas [36-38], where ash is barely observed. Importantly, the presence of specific IgE in the serum of allergic patients against these molecules leads to multiple sensitization processes to different sources as food allergens or contact allergens like latex for the profilins and other pollens in the case of polcalcins.

Prevalence observed for the two recombinant panallergens was 52% and 16% for profilin and polcalcin, respectively. The IgE binding frequency for profilin indicated its role as major allergen in ash-sensitized patients, which is coincident with previous data reported in selected populations of allergic patients [15, 16, 39]. However, the frequency of IgE recognition of polcalcin is neither affected by other homologous allergens nor pollen environmental levels, being considered a minor allergen in all the populations studied including the here analyzed allergic population to *F. excelsior* from Strasbourg (France). Remarkably, median ELISA values showed that although Fra e 3 presents low prevalence is able to recruit more IgEs than Fra e 2 in ash pollen-sensitized patients.

The immunological validation of the here presented allergens against their natural counterparts has been performed by using i) polyclonal antisera raised against olive pollen profilin and polcalcin and ii) a pool of sera from allergic patients. The inhibition experiments showed that the recombinant profilin was unable to completely inhibit the IgG binding to the natural profilin present in the extract. This fact was probably due to the presence of other isoforms recognized by the pAb. On the other hand, rFra e 3 was able to completely abolish the IgG binding to its natural counterpart.

Polymorphism has been a feature currently reported for these allergens and different allergenic capacity has been described for these isoforms [40]. Remarkably, the inhibition achieved with the pool of sera revealed a complete inhibition of the IgE binding to the natural counterpart allergens in ash pollen extract, indicating that rFra e 2 and rFra e 3 contain all the major epitopes recognized by the IgEs present in the serum of ash pollen-sensitized patients. From the here analyzed amino acid sequences and previously described sequences for profilins from other sources, a highly variable region

involving amino acids 17 to 22 was observed. This region of the molecule seems to be no critical for the cell functionality of the protein and for the IgE epitopes so far described [41]. Furthermore, this segment is located at the surface of the protein, and thus it might be a potential interaction region for the IgE-antibodies of particular allergic patients. Although polcalcin IgE epitopes are not reported, the C-terminal of the protein is the area with more ability to recruit IgEs [42]. The alignment of sequences from different sources showed a region comprising the amino acids 4 to 13 of the N-terminal as the most variable part of the protein. These amino acids are not involved in the Ca²⁺-binding site of the protein and are very exposed regions of the molecule. Then, the observed variability in these regions between allergens from different sources or even isoforms inside the same source could promote different IgE-binding patterns [40].

On the other hand, we observed a very high identity at amino acid sequence comparing both allergenic molecules with the closest phylogenetically Oleaceae family, e.g. two and five amino acid changes with *O. europaea* profilin and polcalcin, respectively. Allergenic properties of Oleaceae profilins were observed to be equivalent as showed by ELISA inhibition experiment, except for *Ligustrum vulgare*. Although *L. vulgare* profilin sequence is unknown, a high identity and similarity is expected as in the other Oleaceae counterparts. Then, the low level of inhibition to rFra e 2 is probably due to the low amounts of the natural profilin in the *L. vulgare* pollen extract. On the other hand, food profilins showed similar values of inhibition except *Licopersicum sculentum* and *Arachis hypogea*, which showed low percentages of inhibition. In this case, differences in the highly variable region of the profilins or slightly amino acid changes in the full sequence could be responsible for the low inhibition levels. Regarding, ash pollen polcalcin, we observed similar inhibition values in all allergenic sources tested except for mugwort polcalcin, probably because both sources are phylogenetically distant, with lower identity (61%) and similarity (82%) percentages respect to the other polcalcin.

In summary, the main panallergens from *F. excelsior* pollen have been cloned, expressed as recombinant proteins, purified and structural and immunologically characterized in this work. Both allergens showed high degree of identity comparing with homologous proteins from related and non-related sources, and similar

immunologically characteristics. Despite numerous previous reports about profilin [43], recent experiments showed different IgE-binding ability of profilin isoforms from the same *S. kali* pollen source [40]. Then, these differences could be more important between different species and families. For this and previously mentioned reasons, the availability of these recombinant panallergens could improve i) the study of critical and essential amino acids for the IgE-binding capability, ii) the determination of primary sensitizer, iii) the clinical diagnosis of polysensitization to multiple sources, iv) the standardization of the allergen extracts used in immunotherapy, and v) personalized desensitization of sensitized patients.

Acknowledgements

We want to thank Sara Abián for her excellent technical support. R.B. is a fellow of the Ramón y Cajal program of the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain).

Financial Sources.

This work was supported by grants SAF2008-04053 from the Ministerio de Ciencia e Innovación to Rosalía Rodríguez, and SAF2011-26716 from the Ministerio de Economía y Competitividad and RIRAAF Network RD12/0013/0015 from the ISCIII Mayte Villalba. The rest of the authors do not declare any other funding source.

Conflicts of interest.

All the authors declare no conflicts of interest.

References

1. Quiralte J, Florido F, Arias de Saavedra JM, Gómez A, Sáenz de San Pedro B, González E, Rodríguez R. Olive allergen-specific IgE responses in patients with *Olea europaea* pollinosis. *Allergy*. 2002; 57 Suppl 71:47-52.
2. Quiralte J, Palacios L, Rodríguez R, Cárdena B, De Saavedra JMA, Villalba M, Florido JF, Lahoz C. Modelling diseases: The allergens of *Olea europaea* pollen. *J Invest Allerg Clin*. 2007; 17:24-30.
3. Emberlin J. The effects of patterns in climate and pollen abundance on allergy. *Allergy*. 1994; 49:15-20.
4. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, van Cauwenberge P. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*. 2007; 62:976-90.
5. Niederberger V, Purohit A, Oster JP, Spitzauer S, Valenta R, Pauli G. The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with

- allergens from various plant species. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32:933-41.
6. Villalba M, Batanero E, Monsalve RI, González de la Peña MA, Lahoz C, Rodríguez R. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. *J Biol Chem*. 1994; 269:15217-22.
7. Barderas R, Purohit A, Papanikolaou I, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005; 115:351-7.
8. Jockusch BM, Murk K, Rothkegel M. The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2007; 159:131-49.
9. Engel E, Richter K, Obermeyer G, Briza P, Kungl AJ, Simon B, Auer M, Ebner C, Rheinberger HJ, Breitenbach M, Ferreira F. Immunological and biological properties of Bet v 4, a novel birch pollen allergen with two EF-hand calcium-binding domains. *J Biol Chem*. 1997; 272:28630-7.
10. Rozwadowski K, Zhao R, Jackman L, Huebert T, Burkhardt WE, Hemmingsen SM, Greenwood J, Rothstein SJ. Characterization and immunolocalization of a cytosolic calcium-binding protein from *Brassica napus* and *Arabidopsis* pollen. *Plant physiology*. 1999; 120:787-98.
11. Valenta R, Duchêne M, Breitenbach M, Pettenburger K, Koller L, Rumpold H, Scheiner O, Kraft D. A low molecular weight allergen of white birch (*Betula verrucosa*) is highly homologous to human profilin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1991; 94:368-70.
12. Ledesma A, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem*. 1998; 258:454-9.
13. Martínez A, Asturias JA, Monteseirín J, Moreno V, García-Cubillana A, Hernández M, de la Calle A, Sánchez-Hernández C, Pérez-Formoso JL, Conde J. The allergenic relevance of profilin (Ole e 2) from *Olea europaea* pollen. *Allergy*. 2002; 57 Suppl 71:17-23.
14. Vallier P, Balland S, Harf R, Valenta R, Deviller P. Identification of profilin as an IgE-binding component in latex from *Hevea brasiliensis*: clinical implications. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25:332-9.
15. Barderas R, Villalba M, Pascual CY, Batanero E, Rodríguez R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113:1192-8.
16. López-Torrejón G, Crespo JF, Sánchez-Monge R, Sánchez-Jiménez M, Álvarez J, Rodríguez J, Salcedo G. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. *Clin Exp Allergy*. 2005; 35:1065-72.
17. Barber D, Moreno C, Ledesma A, Serrano P, Galán A, Villalba M, Guerra F, Lombardero M, Rodríguez R. Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2007; 17 Suppl 1:11-6.
18. Mari A. Multiple pollen sensitization: a molecular approach to the diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001; 125:57-65.

19. Ganglberger E, Radauer C, Wagner S, Ríordáin G, Beezhold DH, Brehler R, Niggemann B, Scheiner O, Jensen-Jarolim E, Breiteneder H. Hev b 8, the *Hevea brasiliensis* latex profilin, is a cross-reactive allergen of latex, plant foods and pollen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001; 125:216-27.
20. Wopfner N, Dissertori O, Ferreira F, Lackner P. Calcium-binding proteins and their role in allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2007; 27:29-44.
21. Barber D, de la Torre F, Lombardero M, Antépara I, Colás C, Dávila I, Tabar AI, Vidal C, Villalba M, Salcedo G, Rodríguez R. Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39:1764-73.
22. Sastre J, Landivar ME, Ruiz-García M, Andregnette-Rosigno MV, Mahillo I. How molecular diagnosis can change allergen-specific immunotherapy prescription in a complex pollen area. *Allergy.* 2012; 67:709-11.
23. Barderas R, Villalba M, Lombardero M, Rodríguez R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 127:47-54.
24. Palomares O, Cuesta-Herranz J, Vereda A, Sirvent S, Villalba M, Rodríguez R. Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 94:586-92.
25. Barderas R, Purohit A, Rodríguez R, Pauli G, Villalba M. Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: comparison of the natural and recombinant forms. *Annals of allergy, asthma & immunology* : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 2006; 96:557-63.
26. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol.* 1999; 112:531-52.
27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-10.
28. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006; 22:195-201.
29. Fedorov AA, Ball T, Mahoney NM, Valenta R, Almo SC. The molecular basis for allergen cross-reactivity: crystal structure and IgE-epitope mapping of birch pollen profilin. *Structure.* 1997; 5:33-45.
30. Verdino P, Barderas R, Villalba M, Westritschnig K, Valenta R, Rodríguez R, Keller W. Three-dimensional structure of the cross-reactive pollen allergen Che a 3: visualizing cross-reactivity on the molecular surfaces of weed, grass, and tree pollen allergens. *J Immunol.* 2008; 180:2313-21.
31. Assarehzadegan MA, Amini A, Sankian M, Tehrani M, Jabbari F, Varasteh A. Sal k 4, a new allergen of *Salsola kali*, is profilin: a predictive value of conserved conformational regions in cross-reactivity with other plant-derived profilins. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74:1441-6.
32. Metz-Favre C, Papanikolaou I, Purohit A, Pauli G, de Blay F. The reality of ash pollinosis. *Rev Fr Allergol.* 2010; 50:568-73.
33. Santos A, Van Ree R. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 155:191-204.
34. Ledesma A, Barderas R, Westritschnig K, Quiralte J, Pascual CY, Valenta R, Villalba M, Rodríguez R. A comparative analysis of the cross-reactivity in the polcalcin family including Syr v 3, a new member from lilac pollen. *Allergy.* 2006; 61:477-84.
35. Mas S, Barderas R, Colas C, Quiralte J, Rodríguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization. *The FEBS journal.* 2012; 279:4338-49.
36. Florido JF, Delgado PG, de San Pedro BS, Quiralte J, de Saavedra JM, Peralta V, Valenzuela LR. High levels of *Olea europaea* pollen and relation with clinical findings. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999; 119:133-7.
37. D'Amato G, Lobefalo G. Allergenic pollens in the southern Mediterranean area. *J Allergy Clin Immunol.* 1989; 83:116-22.
38. Gioulekas D, Papakosta D, Damialis A, Spieksma F, Giouleka P, Patakas D. Allergenic pollen records (15 years) and sensitization in patients with respiratory allergy in Thessaloniki, Greece. *Allergy.* 2004; 59:174-84.
39. Asturias JA, Ibarrola I, Fernández J, Arilla MC, González-Rioja R, Martínez A. Pho d 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35:374-81.
40. Mas S, Barderas R, Colás C, Quiralte J, Rodríguez R, Villalba M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform - molecular and immunological characterization. *The FEBS journal.* 2012; 279:4338-49.
41. Tordesillas L, Pacios LF, Palacín A, Cuesta-Herranz J, Madero M, Díaz-Perales A. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40:174-81.
42. Ledesma A, González E, Pascual CY, Quiralte J, Villalba M, Rodríguez R. Are Ca²⁺-binding motifs involved in the immunoglobulin E-binding of allergens? Olive pollen allergens as model of study. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32:1476-83.
43. Sirvent S, Tordesillas L, Villalba M, Díaz-Perales A, Cuesta-Herranz J, Salcedo G, Rodríguez R. Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011; 106:429-35.

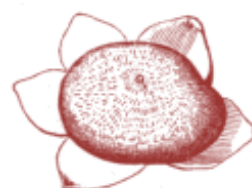
DISCUSIÓN GENERAL



Chenopodium viride.



Chenopodium.
Flower (mag.).



Chenopodium.
Fruit (mag.).



Chenopodium.
Seed cut (mag.).



Beta.
Seed (mag.).



Beta vulgaris.
Flower (mag.).



Beta.
Diagram.



Beta vulgaris.
Fruits (mag.).



Beta vulgaris.
Flower cut vertically (mag.).

Las alergias son un tipo de patologías inflamatorias consecuencia de una respuesta excesiva del sistema inmune frente a sustancias inocuas para el resto de la población [1, 4]. Determinados componentes de algunas fuentes naturales, generalmente de tipo proteico o glicoproteico, pueden actuar como agentes sensibilizadores estimulando la producción de IgE (hipersensibilidad de tipo I) y en posteriores exposiciones desencadenar una reacción alérgica. Existen una gran variedad de fuentes naturales o de síntesis que contienen alérgenos como pueden ser pólenes, alimentos, venenos de himenópteros, ácaros, látex o fármacos. Por tanto, la correcta clasificación médica de las distintas enfermedades alérgicas, que permita la inclusión del paciente dentro de un grupo en función de los componentes a los que es alérgico un individuo requiere de un correcto diagnóstico. Para ello, se necesita un profundo conocimiento de las moléculas que producen estas respuestas alérgicas y disponer de un amplio repertorio de ellas en la clínica que facilite un diagnóstico más eficaz, lo que permitirá un tratamiento más adecuado y personalizado de cada paciente [123, 132-134].

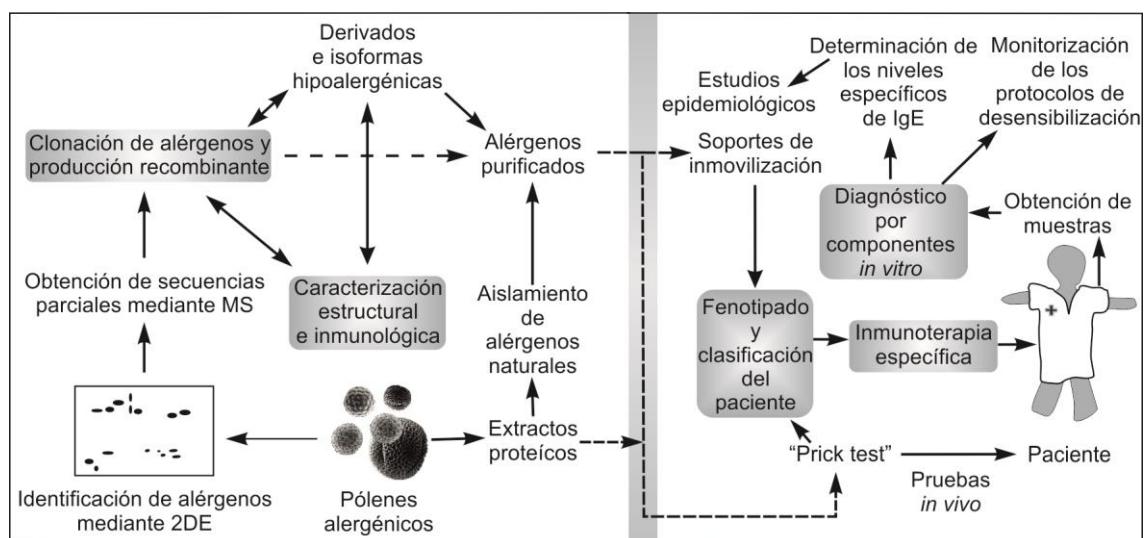


Figura 7: esquema del proceso de obtención y caracterización de alérgenos naturales y recombinantes y su aplicación clínica.

El diagnóstico mediante el uso de baterías de proteínas que incluyan los distintos componentes alergénicos de una fuente es muy útil ya que: i) pueden identificar los alérgenos concretos responsables de la sensibilización en el individuo, incluyendo aquellas isoformas a las que el paciente tenga una mayor o menor reactividad; ii) se puede aconsejar al paciente de manera más precisa qué fuentes alergénicas evitar y así reducir la incidencia de los síntomas, sobretodo en el caso de pacientes con sensibilizaciones a alérgenos que presentan reactividad cruzada; iii) facilita la

identificación de la fuente primaria de sensibilización permitiendo seleccionar con mayor precisión los extractos proteicos o alérgenos purificados para los protocolos de inmunoterapia; iv) permite describir mapas geográficos con los alérgenos más relevantes de cada población; y v) facilita la obtención de perfiles de sensibilización que favorecen la predicción de la enfermedad. En conjunto, toda esta información permite ofrecer a los pacientes una serie de pautas de actuación y unos protocolos de inmunoterapia totalmente personalizados que favorecerían el proceso de desensibilización.

La identificación y estudio de cada uno de los componentes hallados en las distintas fuentes alérgicas es crucial para comprender los mecanismos que subyacen a la respuesta alérgica. Generalmente, las fuentes alérgicas son muestras complejas en las que existe una amplia diversidad de proteínas entre las que se encuentran los alérgenos de interés, que suponen menos de un 0.05% del total de proteínas. Así, el uso de técnicas que permitan identificar y separar las moléculas alérgicas del resto de componentes de la fuente, es esencial en el estudio de las proteínas de interés. Además de las técnicas clásicas de purificación de proteínas, las técnicas proteómicas han permitido resolver e identificar alérgenos presentes en un estrecho intervalo de masas moleculares y puntos isoeléctricos. Entre ellas, la 2DE y la MS se han utilizado satisfactoriamente para la caracterización de alérgenos de diversas fuentes como pólenes (*Olea europaea*), alimentos (*Oryza sativa*), hongos (*Aspergillus fumigatus*) o leche de vaca (*Bos taurus*) [67, 135-138]. La 2DE permite la separación de proteínas en función de la masa molecular y el punto isoeléctrico de éstas, facilitando tanto el estudio del perfil proteico global como el repertorio de alérgenos de una fuente biológica determinada y, dado el elevado grado de polimorfismo que exhiben ciertos alérgenos, las distintas isoformas que éstos puedan presentar. Esta herramienta junto con técnicas de caracterización inmunológica y secuenciación *de novo* mediante MS permite: i) identificar las distintas isoformas que componen un alérgeno polimórfico; ii) analizar las capacidades alérgicas y antigénicas de éstas; iii) conseguir secuencias peptídicas parciales que permitan clasificar el alérgeno dentro de una familia de proteínas; y iv) facilitar la posterior obtención de secuencias de nucleótidos codificantes.

Una vez que se dispone de las secuencias nucleotídicas codificantes de los alérgenos, es posible producirlos como moléculas recombinantes en sistemas heterólogos (*Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, células de insecto o plantas) obteniendo

grandes cantidades de una única isoforma lo que facilita su caracterización estructural y comparación inmunológica con otros alérgenos e isoformas de interés.

En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de fuentes productoras de polen alérgico con relevante importancia clínica como son *Salsola kali* (salsola) y *Fraxinus excelsior* (fresno) mediante técnicas proteómicas e inmunológicas. En este contexto, se pretendió: i) profundizar en las características antigénicas e inmunogénicas de determinados alérgenos, ii) obtener secuencias nucleotídicas para producir como proteínas recombinantes estos alérgenos y poder llevar a cabo su posterior caracterización y iii) estudiar los procesos de reactividad cruzada entre distintas fuentes alérgicas.

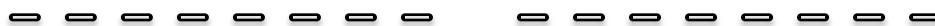


Como consecuencia del proceso de desertización que sufre el sur de Europa, Oriente Medio y los Estados Unidos, se ha incrementado la presencia de determinadas malezas, adaptadas a suelos secos y pobres en nutrientes. Una de estas plantas con importancia a nivel clínico debido a que se trata de una fuente de polen alérgico muy agresivo es *Salsola kali* (Salsola). La mayor presencia de estos vegetales está generando un mayor número de sensibilizaciones a dichas plantas, con el consiguiente coste para las administraciones sanitarias, alcanzando porcentajes de pacientes alérgicos sensibilizados entre el 30% y el 75% en algunas zonas de España, Irán y Arabia Saudí [71, 139, 140].

ARTÍCULO I

Los alérgenos son, generalmente, moléculas muy polimórficas, pudiendo encontrarse en una misma fuente alérgica distintas isoformas con diferentes capacidades antigénicas y alérgicas. Mediante la separación de las isoformas de profilina presentes en el polen de *S. kali* mediante 2DE se pudo determinar que las capacidades de unir IgE e IgG de estas moléculas diferían entre sí (Figura 1A-C). La secuenciación de 2 isoformas, mostró que existían 27 cambios en sus secuencias de aminoácidos, de los cuales 6 eran conservativos (Figura 2A-B). Por lo tanto, se llevó a cabo la producción recombinante de Sal k 4.02 y Sal k 4.03 con el fin de caracterizarlas estructural e inmunológicamente y realizar un estudio de sus capacidades de unir IgG e IgE.

En primer lugar, se determinó que ambas moléculas recombinantes presentaban espectros de CD acordes con los de esta familia de proteínas, observándose que éstos eran similares entre sí, lo que confirmó la equivalencia entre ambas moléculas a nivel de estructura secundaria (Figura 4B-C). La prevalencia de ambos alérgenos se estudió en comparación con el homólogo de *Chenopodium album* (Che a 2, caracterizado frente al alérgeno natural aislado a partir del polen de *C. album* [70]) en una población de pacientes alérgicos a *S. kali*. Se encontraron porcentajes de prevalencia similares entre las 3 profilinas recombinantes, siendo del 29% (48 pacientes de 165) para Che a 2 y Sal k 4.03 y del 24% (40 pacientes de 165) para Sal k 4.02 (Figura 5A). Sin embargo, los valores de reactividad del 86% de los pacientes positivos fueron significativamente menores para Sal k 4.02, mientras que cuando se compararon Che a 2 y Sal k 4.03, éstas mostraron capacidades de unión de IgE similares (Figura 5B). El estudio de la capacidad de unión de IgE que mostraba Sal k 4.02, reducida con respecto a Sal k 4.03 y Che a 2, se abordó mediante ensayos de inhibición entre las tres profilinas. Así, Che a 2 fue capaz de inhibir la unión de IgE a ambas profilinas de *S. kali*, Sal k 4.03 únicamente inhibió a Sal k 4.02 y de ésta última se necesitaron 35 y 100 veces más proteína para inhibir la unión de IgE a Sal k 4.03 y Che a 2, respectivamente (Figura 6A). Por otro lado, los resultados obtenidos comparando las capacidades antigénicas de cada una de las profilinas mostraron que las 3 moléculas recombinantes tenían entre sí una capacidad de unir IgG equivalente (Figura 6B). Esto demuestra que Sal k 4.02 es una molécula con una menor afinidad por la unión de IgE procedente del suero de pacientes sensibilizados a *S. kali*, pero que conserva su capacidad antigénica. Dado que Sal k 4.03 presentó unas características alergénicas intermedias entre Che a 2 y Sal k 4.02 y basándonos en el estudio de las secuencias de aminoácidos y en los 4 epítomos descritos previamente en esta familia de proteínas [93], se propusieron diversos cambios aminoacídicos que podrían modificar significativamente las características moleculares de los epítomos y que por tanto podrían ser responsables de la reducida capacidad de unir IgE de Sal k 4.02. Adicionalmente, este estudio sugiere la posibilidad de utilizar esta molécula en procesos de desensibilización, ya que mantiene su capacidad antigénica pero no su capacidad alergénica, evitando que el paciente pueda sufrir una respuesta adversa no deseada durante el tratamiento.



Las técnicas proteómicas aplicadas al estudio de los alérgenos de *S. kali* y sus isoformas se ha usado también: i) en trabajos previos de este grupo como en la identificación y caracterización del alérgeno principal y marcador de sensibilización, Sal k 1 [99]; ii) en la identificación de un nuevo alérgeno del polen de *S. kali* y iii) en colaboración con otros miembros del laboratorio para la identificación y caracterización de Sal k 5, un nuevo alérgeno perteneciente a la familia de proteínas Ole e 1-like, con prevalencias en pacientes alérgicos a *S. kali* alrededor del 30 al 40% y que puede ser considerado un alérgeno relevante de esta especie vegetal.

ARTÍCULO II

Actualmente el uso de la forma natural de la PME de *S. kali* en clínica es clave para el diagnóstico de la alergia a esta maleza, habiéndose considerado su inclusión recientemente en determinados protocolos diagnósticos. Sin embargo, se trata de un alérgeno muy polimórfico y los rendimientos obtenidos del alérgeno purificado, alrededor de 100 µg por miligramo de polen deshidratado [99], son muy bajos. Por ello, se ha llevado a cabo la clonación y producción recombinante en *E. coli* de una isoforma del alérgeno natural que permita diagnosticar, de la forma más completa posible, las sensibilizaciones de los pacientes a cualquier isoforma pudiendo sustituirla en el diagnóstico *in vitro* por componentes. La proteína recombinante producida fue caracterizada estructural e inmunológicamente, comparándola con la proteína natural y analizando sus capacidades antigénicas y alergénicas. Aunque se observó un incremento en hélice α en la proteína recombinante respecto a la natural, ambas mostraron espectros de CD muy similares (Figura 2A-B), indicando un correcto plegamiento de la proteína recombinante y capacidad para unir IgG de diversos anticuerpos monoclonales y un anticuerpo policlonal (Figura 2C-D). Los porcentajes de prevalencia observados en las tres poblaciones de pacientes estudiadas mostraron valores similares de reactividad frente a la proteína natural (52%, 47 pacientes de 90) o a la proteína recombinante (56%, 50 pacientes de 90), aunque algunos individuos exhibían reactividad exclusivamente frente a una u otra forma del alérgeno (Figura 3A). No obstante, no se observó una buena correlación entre los valores de intensidad de unión de IgE frente a ambas moléculas (Figura 3B), lo que indica que existen diferencias en el reconocimiento de los sueros a la proteína natural y recombinante.

El hecho de que para la producción del alérgeno recombinante se usara como sistema de expresión *E. coli* y que inicialmente Sal k 1 se describiese como una

molécula con polimórfica y glicosilada [99], podría ser una de las causas de las diferencias observadas en los valores de intensidad entre rSal k 1 y nSal k 1, ya que esta bacteria no añade glicosilaciones en las proteínas que produce. Para abordar este problema se estudió la reactividad frente a carbohidratos de las poblaciones de sueros mediante una proteína vegetal que presenta glicosilaciones típicas de proteínas de plantas [141]. Se observó que únicamente 6 de los 90 pacientes estudiados tuvieron valores positivos frente a carbohidratos y no existía una relación directa entre el hecho de que estos pacientes no fueran reactivos a la proteína recombinante y sí a carbohidratos (Figura 3A). Por otro lado, los valores de intensidad de la unión de IgE frente a la proteína recombinante y natural observados en condiciones desnaturalizantes correlacionaban perfectamente (Figura 3C), a diferencia de los valores observados en condiciones nativas, indicando la presencia de epítomos secuenciales comunes en ambas proteínas. Por lo tanto, es posible que la diferencia de reactividad pudiera deberse a cambios en la estructura secundaria local de los epítomos conformacionales. Los ensayos de inhibición entre ambas moléculas mostraron resultados similares en cuanto a que la proteína recombinante no fue capaz de inhibir por completo a la proteína natural en condiciones nativas, mientras que sí lo hizo en condiciones reductoras (Figura 4D). Adicionalmente se observó que determinados pacientes mostraron reactividad positiva frente a la molécula recombinante pero no frente a la natural, posiblemente por la presencia de diversas isoformas en el polen de *S. kali*, lo que reduce el contenido en la forma alérgica sensibilizante para ese paciente, mientras que en el caso de la molécula recombinante una única isoforma se encuentra presente.

Estudios poblacionales previos de pacientes alérgicos a pólenes y pacientes alérgicos a pólenes y alimentos mostraron una mayor prevalencia de Sal k 1 en el segundo grupo de estudio [142]. En base a estas observaciones se seleccionaron aquellas fuentes de alimentos que parecían presentar una asociación clínica con la sensibilización a Sal k 1 y mediante el uso del antisuero policlonal dirigido frente a nSal k 1, tras lo cual se demostró que algunas de estas fuentes presentaban reactividad cruzada frente a rSal k 1, confirmando el posible papel de Sal k 1 en procesos de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos.

Finalmente, a pesar de las discrepancias observadas en cuanto a las capacidades de unir IgE de determinados pacientes frente a la proteína recombinante, el alérgeno recombinante aquí caracterizado podría sustituir, o al menos suplementar a la natural

tanto en el diagnóstico de alergia a *S. kali*, como en posibles protocolos de desensibilización mediante inmunoterapia. Además, en este trabajo se ha confirmado el papel que pueden tener las PMEs de distintas fuentes alérgicas en procesos de reactividad cruzada, por lo que se abren nuevas vías para el estudio de PMEs alérgicas de otras fuentes biológicas y los procesos de polisensibilización en los que puede estar implicada.

ARTÍCULO III

El análisis del perfil alérgico del polen de *S. kali* mediante sueros individuales de pacientes alérgicos permitió observar que una banda de alrededor de 28 kDa era reconocida por un elevado número de sueros (Figura suplementaria 1). El uso de la 2DE acoplada a la secuenciación *de novo* mediante MS permitió el análisis de la estructura primaria de la proteína y su identificación y secuenciación. La molécula alérgica se localizó por su capacidad para unir IgE procedente de pacientes alérgicos a *S. kali*, tras lo cual, en una réplica del gel bidimensional, se obtuvo una muestra del gel que contenía la proteína y se utilizó para llevar a cabo la secuenciación *de novo* mediante MS (Figura 1). La obtención de una secuencia parcial, correspondiente a una proteína de la familia de las poligalacturonidasas (PG), permitió la clonación a partir del cDNA total presente en el polen de *S. kali* de una secuencia codificante para una proteína de 40 kDa (Figura 2). La secuencia de aminoácidos obtenida, a partir del cDNA, presentaba porcentajes de identidad y similitud con otras fuentes alérgicas que oscilaban entre el 22-40% y el 40-58%, respectivamente (Figura 3), por lo que se trata de un grupo de moléculas alérgicas muy heterogéneo. La caracterización inmunológica y estructural de la PG identificada se llevó a cabo mediante el uso de la proteína recombinante obtenida en *E. coli* (Figura 4). En primer lugar, mediante ensayos de inhibición con la proteína recombinante se confirmó que la molécula de 28 kDa secuenciada inicialmente es un producto de la degradación espontánea de estas proteínas, hecho que se apreció desde el inicio de la purificación de la proteína recombinante de 47 kDa (Figura 5A). Utilizando la proteína recombinante se determinó que el 30% de los 88 pacientes alérgicos a *S. kali* testados tenían IgE específicas dirigidas frente a esta molécula, tratándose de un alérgeno minoritario (Figura 5 B-D). La misma molécula recombinante fue capaz de inhibir a la forma natural presente en el polen, por lo que mantenía las mismas características alérgicas que la natural. La obtención de un anticuerpo policlonal de ratón dirigido frente

a la PG recombinante permitió identificar otras fuentes vegetales de pólenes que presentaban reactividad cruzada frente a Sal k 6 (Figura 6A). Además, se determinó que algunas de estas fuentes presentaban reactividad cruzada a nivel de IgE, por lo que potencialmente son nuevas fuentes de estudio de las PG alergénicas que contienen (Figura 6B-C).



Debido al aumento del uso de *Fraxinus excelsior* (fresno) como fuente para la obtención de madera se ha producido un incremento de la presencia de este árbol en el centro y norte de Europa. Además, el hecho de que su período de polinización coincida con el de *Betula verrucosa* (abedul) ha dado lugar a que pase relativamente desapercibido como fuente alergénica en la clínica [143, 144], ya que la mayoría de los pacientes que acudían a las consultas con síntomas de polinosis durante los meses de abril a julio eran diagnosticados de alergia a abedul.

ARTÍCULO IV

La caracterización inmunoproteómica del perfil alergénico del polen de *F. excelsior* permitió la identificación de las coordenadas de masa molecular y punto isoeléctrico de 9 proteínas responsables del 95% de la unión de IgE de sueros de pacientes alérgicos a fresno procedentes de Estrasburgo. Los alérgenos se identificaron mediante 2DE combinada con el uso de anticuerpos policlonales específicos dirigidos frente a alérgenos caracterizados del polen de *O. europaea* (olivo), otro miembro de la familia Oleaceae, observándose en éstos un alto grado de polimorfismo (Figura 1A-D). La comparación de las secuencias aminoacídicas de 5 de los alérgenos de *F. excelsior* conocidos y la secuenciación de un nuevo alérgeno, con los homólogos descritos en *O. europaea*, demostró un elevado porcentaje de identidad y similitud entre ambas fuentes alergénicas (Figura 2A). Además, los ensayos de reactividad cruzada confirmaron la semejanza de los epítomos IgE entre ambas fuentes, pues los alérgenos naturales aislados del polen de *O. europaea*, fueron capaces de inhibir la unión de IgE a los homólogos hallados en *F. excelsior* (Figura 2B-C). Una característica fundamental de esta población de pacientes y que apoya los estudios aquí realizados, fue la ausencia de un historial migratorio desde o hacia zonas del Mediterráneo, por lo que no podían ser

susceptibles de sufrir una sensibilización primaria a olivo. Por lo tanto, la elevada identidad entre los componentes alergénicos de ambas fuentes, superior al 90%, permitió estudiar una población de pacientes alérgicos a *F. excelsior* y obtener la prevalencia y la potencia alergénica de cada uno de las moléculas identificadas a través de los alérgenos naturales de *O. europaea* (Figura 2D-E). La similitud filogenética entre *F. excelsior* y *O. europaea* y los ensayos realizados en los trabajos presentados sugieren el uso indistinto de los extractos proteicos procedentes de una u otra fuente para el diagnóstico de la alergia. Los protocolos de desensibilización deberían, sin embargo, incluir aquellos extractos proteicos o alérgenos naturales purificados con mayor prevalencia en el área donde viven los pacientes, ya que probablemente sean éstas las fuentes alergénicas de sensibilización de estos pacientes.

ARTÍCULO V

La importancia del fresno como fuente alergénica y su implicación en procesos de reactividad cruzada con otro miembro de la familia Oleaceae, queda de manifiesto en los resultados obtenidos previamente en la caracterización de su perfil alergénico. La secuenciación de la profilina de fresno y su caracterización estructural e inmunológica junto con la polcalcina de fresno permitió el estudio en profundidad de estos alérgenos. Dado que estas proteínas se pueden hallar en fuentes diversas de pólenes, alimentos o en látex en el caso de las profilinas y específicamente en pólenes en el caso de las polcalcinas, se pretendió estudiar en detalle los procesos de reactividad cruzada en los que están implicados estos panalérgenos.

Las moléculas recombinantes producidas presentaban características estructurales típicas de estos panalérgenos como son un punto isoeléctrico ácido, masas moleculares comprendidas entre 9 y 14 kDa y espectros de dicroísmo circular (CD) con un contenido mayoritario en lámina β para las profilinas y de hélice α para las polcalcinas (Figura 4A-B). La caracterización inmunológica mediante el uso de anticuerpos policlonales dirigidos frente a la polcalcina y la profilina mostró que únicamente la polcalcina recombinante era capaz de inhibir la unión del anticuerpo a la forma natural (Figura 4C). Este hecho se explica por la presencia en el polen de otras isoformas de profilina natural con epítopos IgG distintos a los hallados en la profilina recombinante. No obstante, ambos panalérgenos recombinantes fueron capaces de inhibir la unión de

IgE procedente del suero de pacientes alérgicos a las formas naturales presentes en el polen de *F. excelsior*, sugiriendo en este caso, que los epítomos IgE principales entre moléculas naturales y recombinantes son equivalentes (Figura 5C).

Confirmando el trabajo presentado en el artículo I, los valores de inhibición de fuentes relacionadas filogenéticamente como *O. europaea* frente a los panalérgenos recombinantes obtenidos, mostraron niveles de inhibición próximos a los de la inhibición realizada con *F. excelsior*, en la que se obtuvieron valores del 72 y 85%, mientras que los de *O. europaea* fueron del 67 y el 81% para polcalcina y profilina, respectivamente. Sin embargo, se observaron niveles de inhibición menores, entre el 5 y el 38%, cuando las fuentes comparadas tenían porcentajes más bajos de identidad y similitud (Tabla 1). No obstante, la reactividad de cada fuente frente a las IgE de los pacientes fue muy heterogénea, por lo que serían necesarios estudios más detallados de cada fuente alergénica. Por lo tanto, estos estudios de reactividad cruzada realizados con las proteínas recombinantes frente a distintas fuentes alergénicas de polen y alimentos, así como su comparación a nivel de secuencia, muestran que sutiles diferencias entre alérgenos casi idénticos pueden dar lugar a distintas capacidades de unión de anticuerpos IgE. Los alérgenos aquí estudiados, a pesar de tratarse de moléculas de pequeño tamaño (134 y 84 aminoácidos para Fra e 2 y Fra e 3, respectivamente) y tener una función biológica muy conservada, tienen ciertas regiones de entre 5 a 9 aminoácidos que engloban zonas expuestas en la superficie de la molécula y que se encuentran poco conservadas [95, 145] (Figura 2A-B). Estas regiones podrían favorecer las diferencias observadas en cuanto a reactividad cruzada entre las distintas fuentes alergénicas, ya que darían lugar a distintos patrones de reconocimiento por las IgE debido a pequeños cambios aminoacídicos [95].

CONCLUSIONES



Bloque I. Caracterización e identificación de alérgenos relevantes del polen de *Salsola kali*

ARTÍCULO I

Se han clonado y producido en *Escherichia coli* como proteínas recombinantes y caracterizado dos isoformas de la profilina alérgénica presentes en el polen de *S. kali* (Sal k 4.02 y Sal k 4.03), comparándolas con Che a 2, el alérgeno homólogo del polen de *Chenopodium album*.

Las 3 proteínas estudiadas mostraron porcentajes de estructura secundaria similares y la misma capacidad de unir IgG.

Su capacidad de unir IgE era significativamente diferente. Se necesitó aumentar la cantidad de Sal k 4.02 entre 35 y 100 veces para inhibir la unión de IgE a Sal k 4.03 y Che a 2, respectivamente.

Este estudio demuestra la necesidad de caracterizar estructural e inmunológicamente de forma exhaustiva las diversas isoformas de un mismo alérgeno, pues las diferencias a nivel de secuencia aminoacídica encontradas en las isoformas naturales pueden suponer cambios importantes en el reconocimiento por las IgEs de pacientes.

Sal k 4.02 es una proteína con capacidad alérgénica reducida –hipoalérgeno–, pero con capacidad antigénica equivalente al resto de las profilinas estudiadas y por lo tanto un buen candidato para su uso en protocolos de desensibilización pues evitaría riesgos durante el proceso de sensibilización por unir menores niveles de IgE.

ARTÍCULO II

Se ha obtenido una isoforma recombinante en *E. coli* del marcador de sensibilización de alergia al polen de *S. kali*, la pectínmetilesterasa (Sal k 1), que muestra características estructurales similares a las de la forma natural.

La caracterización inmunológica con anticuerpos monoclonales y un anticuerpo policlonal mostró el elevado grado de equivalencia existente entre la forma natural y recombinante, observándose que ambas moléculas mostraban capacidades similares de unión IgG.

Los porcentajes de prevalencia relativos al número de pacientes reactivos a los alérgenos recombinante y natural fueron similares (56 y 52% respectivamente),

mientras que los valores de IgE observados entre ambas moléculas fueron idénticos únicamente en ensayos en los que ambas proteínas se testaron en condiciones desnaturalizantes.

La molécula recombinante permitió realizar estudios de reactividad cruzada, determinándose que Sal k 1 es un alérgeno implicado en reactividad cruzada entre pólenes y alimentos.

La producción de Sal k 1 recombinante solventa los problemas del elevado polimorfismo y bajo rendimiento de la forma natural por lo que sería de utilidad tanto en el diagnóstico como en protocolos de desensibilización de pacientes alérgicos al marcador de sensibilización al polen de *S. kali*.

ARTÍCULO III

Se ha identificado mediante 2DE y secuenciación *de novo* mediante MS un nuevo alérgeno de *S. kali*.

Tras su clonaje se ha demostrado que el polipéptido de 28 kDa, del cual se obtuvo la muestra para secuenciar la proteína mediante secuenciación *de novo* por espectrometría de masas, correspondía a fragmentos de degradación, o a la forma truncada de una PG de 45 kDa (Sal k 6).

La producción de la proteína íntegra como una molécula recombinante en *E. coli* permitió su estudio en profundidad, encontrándose que este alérgeno presenta propiedades inmunológicas similares a las de la forma natural.

Se obtuvo un anticuerpo policlonal dirigido frente a la forma recombinante tras inmunizar ratones Balb/c.

El anticuerpo policlonal y ensayos con sueros de pacientes alérgicos permitieron identificar moléculas homólogas a la PG de *S. kali* en otras fuentes alérgicas.

Sal k 6 está implicado en procesos de reactividad cruzada principalmente entre pólenes.

Bloque II. Estudio del polen de *Fraxinus excelsior* como una fuente alérgica relevante en Europa

ARTÍCULO IV

Mediante técnicas inmunoproteómicas se han identificado las coordenadas de masa molecular y punto isoeléctrico de 9 alérgenos del polen de *F. excelsior* responsables del 95% de la unión IgE de suero de pacientes de Estrasburgo alérgicos a este polen: Fra e 1, Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra e 10, Fra e 11 y Fra e 12.

Se han depositado en las bases de datos las secuencias de 6 alérgenos presentes en el polen de *F. excelsior* (Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 10, Fra e 11 y Fra e 12) y se ha determinado el grado de identidad y similitud existente entre las secuencias de aminoácidos de los alérgenos del polen de *F. excelsior* y *Olea europaea*, observándose valores de identidad de secuencia superiores al 90%.

El uso de las proteínas naturales purificadas de *O. europaea* permitió confirmar la identidad y similitud de secuencia existente a nivel de IgE y determinar la prevalencia de los alérgenos del polen de *F. excelsior*.

Este estudio sugiere la posibilidad del uso indistinto del extracto proteico del polen de olivo y fresno en el diagnóstico clínico de la alergia a estas fuentes polínicas.

ARTÍCULO V

Se ha clonado, expresado en *E. coli* como proteína recombinante y purificado la profilina del polen de *F. excelsior* (Fra e 2). Se han determinado las características estructurales e inmunológicas de los panalérgenos recombinantes profilina (Fra e 2) y polcalcina (Fra e 3) del polen de *F. excelsior*.

Ambos panalérgenos recombinantes mostraron unas características estructurales e inmunológicas similares a las formas naturales encontradas en el polen de *F. excelsior*.

La profilina recombinante presentó una menor capacidad de unir IgG que la forma natural, mientras que la capacidad de unir IgE de ambas moléculas recombinantes fue equivalente a la de sus homólogos naturales.

El estudio de la unión de IgE de estas moléculas recombinantes frente a diversas fuentes polínicas y de alimentos mostró valores muy similares cuanto mayor fue la identidad de secuencia de los alérgenos estudiados, mientras que aquellas fuentes que

presentaban una menor relación filogenética mostraron mayores diferencias en cuanto a su capacidad para unir IgE.

Aunque determinados alérgenos presenten secuencias muy conservadas filogenéticamente, pequeños cambios en su secuencia aminoacídica que no alteren sus funciones pueden modular las capacidades antigénicas y alergénicas de estas moléculas.

1. Von Pirquet, C. Allergie. **Ann Allergy**, 1946. **4**(5): p. 388-90.
2. Lachmann, P.J., *Clinical aspects of immunology*, 5th ed, 1993, Blackwell Scientific Publications.
3. Barnes, K.C. Evidence for common genetic elements in allergic disease. **J Allergy Clin Immunol**, 2000. **106**(5 Suppl): p. S192-200.
4. Togias, A.G. Systemic immunologic and inflammatory aspects of allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, 2000. **106**(5 Suppl): p. S247-50.
5. Leynaert, B., Neukirch, F., Demoly, P., and Bousquet, J. Epidemiologic evidence for asthma and rhinitis comorbidity. **J Allergy Clin Immunol**, 2000. **106**(5 Suppl): p. S201-5.
6. Sibbald, B. Epidemiology of allergic rhinitis. **Monogr Allergy**, 1993. **31**: p. 61-79.
7. Balatsouras, D.G., Koukoutsis, G., Ganelis, P., Fassolis, A., Korres, G.S., and Kaberos, A. Study of allergic rhinitis in childhood. **Int J Otolaryngol**, 2011. **2011**: p. 487532.
8. Asher, M.I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C.K., Strachan, D.P., Weiland, S.K., and Williams, H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. **Lancet**, 2006. **368**(9537): p. 733-43.
9. Ishizaka, K., Ishizaka, T., and Hornbrook, M.M. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. **J Immunol**, 1966. **97**(1): p. 75-85.
10. Munshi, A.H. Gene expression in allergenic pollen. **Aerobiologia**, 2000. **16**(3-4): p. 331-334.
11. Nicolai, T., Carr, D., Weiland, S.K., Duhme, H., von Ehrenstein, O., Wagner, C., and von Mutius, E. Urban traffic and pollutant exposure related to respiratory outcomes and atopy in a large sample of children. **Eur Respir J**, 2003. **21**(6): p. 956-63.
12. Bartra, J., Mullol, J., del Cuvillo, A., Dávila, I., Ferrer, M., Jáuregui, I., Montoro, J., Sastre, J., and Valero, A. Air pollution and allergens. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 2007. **17 Suppl 2**: p. 3-8.
13. Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G., and van Ree, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
14. Godthelp, T., Fokkens, W.J., Kleinjan, A., Holm, A.F., Mulder, P.G., Prens, E.P., and Rijntes, E. Antigen presenting cells in the nasal mucosa of patients with allergic rhinitis during allergen provocation. **Clin Exp Allergy**, 1996. **26**(6): p. 677-88.
15. Suri, A., Lovitch, S.B., and Unanue, E.R. The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. **Curr Opin Immunol**, 2006. **18**(1): p. 70-77.
16. Quiralte, J., Llanes, E., Barral, P., Arias de Saavedra, J.M., Sáenz de San Pedro, B., Villalba, M., Florido, J.F., Rodríguez, R., Lahoz, C., and Cárdbaba, B. Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. **Allergy**, 2005. **60**(3): p. 360-5.
17. Cárdbaba, B., Cortegano, I., Florido, F., Arrieta, I., Aceituno, E., del Pozo, V., Gallardo, S., Rojo, M., Palomino, P., and Lahoz, C. Genetic restrictions in olive pollen allergy. **J Allergy Clin Immunol**, 2000. **105**(2 Pt 1): p. 292-8.
18. Cárdbaba, B., Vilches, C., Martín, E., de Andrés, B., del Pozo, V., Hernández, D., Gallardo, S., Fernández, J.C., Villalba, M., Rodríguez, R., and et al. DR7 and DQ2 are positively associated with immunoglobulin-E response to the main antigen of olive pollen (Ole e I) in allergic patients. **Hum Immunol**, 1993. **38**(4): p. 293-9.
19. Hakonarson, H. and Halapi, E. Genetic analyses in asthma: current concepts and future directions. **Am J Pharmacogenomics**, 2002. **2**(3): p. 155-66.
20. Quiralte, J., Palacios, L., Rodríguez, R., Cárdbaba, B., Arias de Saavedra, J.M., Villalba, M., Florido, J.F., and Lahoz, C. Modelling diseases: the allergens of *Olea europaea* pollen. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 2007. **17 Suppl 1**: p. 24-30.
21. Jahn-Schmid, B., Fischer, G.F., Bohle, B., Faé, I., Gadermaier, G., Dedic, A., Ferreira, F., and Ebner, C. Antigen presentation of the immunodominant T-cell epitope of the major mugwort pollen allergen, Art v 1, is associated with the expression of HLA-DRB1*01. **J Allergy Clin Immunol**, 2005. **115**(2): p. 399-404.
22. Adkinson, N.F. and Middleton, E., *Middleton's allergy : principles & practice*, 7th ed, 2009, Mosby/Elsevier.
23. Vercelli, D., *Immunobiology of IgE*. In: N. Adkinson, B. Bochner, W. Busse, S. Holgate, R. Lemanske, and F. Simons. *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, 7th ed, 2009, Mosby Elsevier.

24. Gould, H.J. and Sutton, B.J. IgE in allergy and asthma today. **Nat Rev Immunol**, 2008. **8**(3): p. 205-17.
25. MacGlashan, D., Jr. IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. **Curr Opin Immunol**, 2008. **20**(6): p. 717-23.
26. Draber, P., Halova, I., Levi-Schaffer, F., and Draberova, L. Transmembrane adaptor proteins in the high-affinity IgE receptor signaling. **Front Immunol**, 2011. **2**: p. 95.
27. Rivera, J., Fierro, N.A., Olivera, A., and Suzuki, R. New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE. **Adv Immunol**, 2008. **98**: p. 85-120.
28. Gilfillan, A.M. and Rivera, J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. **Immunol Rev**, 2009. **228**(1): p. 149-69.
29. Howarth, P.H., Bradding, P., Quint, D., Redington, A.E., and Holgate, S.T. Cytokines and airway inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, 1994. **725**: p. 69-82.
30. Klementsson, H. Eosinophils and the pathophysiology of allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, 1992. **22**(12): p. 1058-64.
31. Wegner, C.D., Gundel, R.H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L.G., and Rothlein, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. **Science**, 1990. **247**(4941): p. 456-9.
32. Tan, R.A. and Corren, J. The Relationship of Rhinitis and Asthma, Sinusitis, Food Allergy, and Eczema. **Immunol Allergy Clin**, 2011. **31**(3): p. 481-+.
33. van der Hulst, A.E., Klip, H., and Brand, P.L.P. Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: A systematic review. **J Allergy Clin Immunol**, 2007. **120**(3): p. 565-569.
34. Andrés, L.P.U.h.b.g.e.b.i.C., *Facetas inéditas en asma bronquial*, 2000, Editores Médicos.
35. Kaulfurst-Soboll, H., Mertens, M., Brehler, R., and von Schaewen, A. Reduction of cross-reactive carbohydrate determinants in plant foodstuff: elucidation of clinical relevance and implications for allergy diagnosis. **PLoS One**, 2011. **6**(3): p. e17800.
36. Ott, H., Schröder, C., Raulf-Heimsoth, M., Mahler, V., Ocklenburg, C., Merk, H.F., and Baron, J.M. Microarrays of recombinant *Hevea brasiliensis* proteins: a novel tool for the component-resolved diagnosis of natural rubber latex allergy. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 2010. **20**(2): p. 129-38.
37. Asero, R. Tomato allergy: clinical features and usefulness of current routinely available diagnostic methods. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 2013. **23**(1): p. 37-42.
38. Michel, Y., McIntyre, M., Ginglinger, H., Ollert, M., Cifuentes, L., Blank, S., and Spillner, E. The putative serine protease inhibitor Api m 6 from *Apis mellifera* venom: recombinant and structural evaluation. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 2012. **22**(7): p. 476-84.
39. Casquete-Roman, E., Rosado-Gil, T., Postigo, I., Pérez-Vicente, R., Fernández, M., Torres, H.E., and Martínez-Quesada, J. Contribution of molecular diagnosis of allergy to the management of pediatric patients with allergy to pollen. **J Investig Allergol Clin Immunol**, 2009. **19**(6): p. 439-45.
40. Ott, H., Fölster-Holst, R., Merk, H.F., and Baron, J.M. Allergen microarrays: a novel tool for high-resolution IgE profiling in adults with atopic dermatitis. **Eur J Dermatol**, 2010. **20**(1): p. 54-61.
41. Incorvaia, C. and Frati, F. One century of allergen-specific immunotherapy for respiratory allergy. **Immunotherapy**, 2011. **3**(5): p. 629-35.
42. Bousquet, J., Lockey, R., and Malling, H.J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **J Allergy Clin Immunol**, 1998. **102**(4 Pt 1): p. 558-62.
43. Reisinger, J., Horak, F., Pauli, G., van Hage, M., Cromwell, O., König, F., Valenta, R., and Niederberger, V. Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. **J Allergy Clin Immunol**, 2005. **116**(2): p. 347-54.
44. Jutel, M., Jaeger, L., Suck, R., Meyer, H., Fiebig, H., and Cromwell, O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. **J Allergy Clin Immunol**, 2005. **116**(3): p. 608-13.
45. van der Giessen, M., Homan, W.L., van Kernbeek, G., Aalberse, R.C., and Dieges, P.H. Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, 1976. **50**(5): p. 625-40.
46. Wachholz, P.A. and Durham, S.R. Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 2004. **4**(4): p. 313-8.

47. Till, S.J., Francis, J.N., Nouri-Aria, K., and Durham, S.R. Mechanisms of immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol**, 2004. **113**(6): p. 1025-34; quiz 1035.
48. Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A.K., Akkoc, T., Akdis, M., and Akdis, C.A. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. **Eur J Immunol**, 2010. **40**(5): 1232-40.
49. Akdis, M. and Akdis, C.A. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. **Nat Rev Drug Discov**, 2009. **8**(8): p. 645-60.
50. Pauli, G., Larsen, T.H., Rak, S., Horak, F., Pastorello, E., Valenta, R., Purohit, A., Arvidsson, M., Kavina, A., Schroeder, J.W., Mothes, N., Spitzauer, S., Montagut, A., Galvain, S., Melac, M., André, C., Poulsen, L.K., and Malling, H.J. Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. **J Allergy Clin Immunol**, 2008. **122**(5): p. 951-60.
51. Pauli, G. and Malling, H.J. The current state of recombinant allergens for immunotherapy. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 2010. **10**(6): p. 575-81.
52. González, E.M., Villalba, M., Lombardero, M., Aalbers, M., van Ree, R., and Rodríguez, R. Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools. **Mol Immunol**, 2002. **39**(1-2): p. 93-101.
53. Pazmandi, K., Kumar, B.V., Szabo, K., Boldogh, I., Szoor, A., Vereb, G., Veres, A., Lanyi, A., Rajnavolgyi, E., and Bacsí, A. Ragweed subpollen particles of respirable size activate human dendritic cells. **PLoS One**, 2012. **7**(12): p. e52085.
54. Bacsí, A., Choudhury, B.K., Dharajiya, N., Sur, S., and Boldogh, I. Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases. **J Allergy Clin Immunol**, 2006. **118**(4): p. 844-50.
55. Prado, N., Alché, J.D., Casado-Vela, J., Mas, S., Villalba, M., Rodríguez, R., and Batanero, E. Nanovesicles are secreted during pollen germination and pollen tube growth: a possible role in fertilization. **Mol Plant**, 2013.
56. Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L.M., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C., and Rodríguez, R. The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. **Eur J Biochem**, 1993. **216**(3): p. 863-9.
57. Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C., and Rodríguez, R. Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity. **J Biol Chem**, 1994. **269**(21): p. 15217-22.
58. Asturias, J.A., Arilla, M.C., Gómez-Bayón, N., Martínez, J., Martínez, A., and Palacios, R. Cloning and expression of the panallergen profilin and the major allergen (Ole e 1) from olive tree pollen. **J Allergy Clin Immunol**, 1997. **100**(3): p. 365-72.
59. Ledesma, A., Villalba, M., Batanero, E., and Rodríguez, R. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. **Eur J Biochem**, 1998. **258**(2): p. 454-9.
60. Boluda, L., Alonso, C., and Fernández-Caldas, E. Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of *Olea europaea*. **J Allergy Clin Immunol**, 1998. **101**(2 Pt 1): p. 210-6.
61. Alché, J.D., Corpas, F.J., Rodríguez-García, M.I., and del Río, L.A. Identification and immunolocalization of superoxide dismutase isoenzymes of olive pollen. **Physiol Plantarum**, 1998. **104**(4): p. 772-776.
62. Batanero, E., Ledesma, A., Villalba, M., and Rodríguez, R. Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen. **FEBS Lett**, 1997. **410**(2-3): p. 293-6.
63. Tejera, M.L., Villalba, M., Batanero, E., and Rodríguez, R. Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen. **J Allergy Clin Immunol**, 1999. **104**(4 Pt 1): p. 797-802.
64. Ledesma, A., Villalba, M., and Rodríguez, R. Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca²⁺-binding protein from olive pollen with allergenic activity. **FEBS Lett**, 2000. **466**(1): p. 192-6.
65. Huecas, S., Villalba, M., and Rodríguez, R. Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity. **J Biol Chem**, 2001. **276**(30): p. 27959-66.
66. Barral, P., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Villalba, M., and Rodríguez, R. A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies [correction of interspecie] cross-reactivity. **J Immunol**, 2004. **172**(6): p. 3644-51.

67. Salamanca, G., Rodríguez, R., Quiralte, J., Moreno, C., Pascual, C.Y., Barber, D., and Villalba, M. Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree. **FEBS J**, 2010. **277**(13): p. 2729-39.
68. Barderas, R., Purohit, A., Papanikolaou, I., Rodríguez, R., Pauli, G., and Villalba, M. Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1. **J Allergy Clin Immunol**, 2005. **115**(2): p. 351-7.
69. Barderas, R., Villalba, M., Lombardero, M., and Rodríguez, R. Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen. **Int Arch Allergy Immunol**, 2002. **127**(1): p. 47-54.
70. Barderas, R., Villalba, M., Pascual, C.Y., Batanero, E., and Rodríguez, R. Profilin (Che a 2) and polcalcin (Che a 3) are relevant allergens of *Chenopodium album* pollen: isolation, amino acid sequences, and immunologic properties. **J Allergy Clin Immunol**, 2004. **113**(6): p. 1192-8.
71. Carnés, J., Fernández-Caldas, E., Marina, A., Alonso, C., Lahoz, C., Colás, C., and Lezaun, A. Immunochemical characterization of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen extracts. Purification of the allergen Sal k 1. **Allergy**, 2003. **58**(11): p. 1152-6.
72. Assarehzadegan, M.A., Sankian, M., Jabbari, F., Tehrani, M., Falak, R., and Varasteh, A. Identification of methionine synthase (Sal k 3), as a novel allergen of *Salsola kali* pollen. **Mol Biol Rep**, 2011. **38**(1): p. 65-73.
73. Mas, S., Barderas, R., Colás, C., Quiralte, J., Rodríguez, R., and Villalba, M. The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization. **FEBS J**, 2012. **279**(23): p. 4338-49.
74. Assarehzadegan, M.A., Amini, A., Sankian, M., Tehrani, M., Jabbari, F., and Varasteh, A. Sal k 4, a new allergen of *Salsola kali*, is profilin: a predictive value of conserved conformational regions in cross-reactivity with other plant-derived profilins. **Biosci Biotechnol Biochem**, 2010. **74**(7): p. 1441-6.
75. Castro, L., Mas, S., Barderas, R., Colás, C., García-Sellés, J., Barber, D., Rodríguez, J., and Villalba, M. Sal k 5, a member of the widespread Ole e 1-like protein family, is a new allergen of Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. **Int Arch Allergy Immunol**, 2013. **(In press)**.
76. Punta, M., Coghill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A., and Finn, R.D. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, 2012. **40**(Database issue): p. D290-301.
77. King, T.P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A., and Thomas, W. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. **Int Arch Allergy Immunol**, 1994. **105**(3): p. 224-33.
78. Mari, A., Rasi, C., Palazzo, P., and Scala, E. Allergen databases: current status and perspectives. **Curr Allergy Asthma Rep**, 2009. **9**(5): p. 376-83.
79. Tang, W., Ezcurra, I., Muschietti, J., and McCormick, S. A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2. **Plant Cell**, 2002. **14**(9): p. 2277-87.
80. Lombardero, M., Obispo, T., Calabozo, B., Lezaún, A., Polo, F., and Barber, D. Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins. **Allergy**, 2002. **57 Suppl 71**: p. 29-34.
81. Palomares, O., Swoboda, I., Villalba, M., Balic, N., Spitzauer, S., Rodríguez, R., and Valenta, R. The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae. **Int Arch Allergy Immunol**, 2006. **141**(2): p. 110-8.
82. Barderas, R., Purohit, A., Rodríguez, R., Pauli, G., and Villalba, M. Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: comparison of the natural and recombinant forms. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 2006. **96**(4): p. 557-63.
83. Batanero, E., Villalba, M., Lopez-Otín, C., and Rodríguez, R. Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms. **Eur J Biochem**, 1994. **221**(1): p. 187-93.
84. Batanero, E., González De La Peña, M.A., Villalba, M., Monsalve, R.I., Martín-Esteban, M., and Rodríguez, R. Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen. **Clin Exp Allergy**, 1996. **26**(12): p. 1401-10.
85. Batanero, E., Crespo, J.F., Monsalve, R.I., Martín-Esteban, M., Villalba, M., and Rodríguez, R. IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. **J Allergy Clin Immunol**, 1999. **103**(1 Pt 1): p. 147-53.

86. Mockrin, S.C. and Korn, E.D. Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. **Biochemistry**, 1980. **19**(23): p. 5359-62.
87. Valenta, R., Duchêne, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., and Scheiner, O. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. **Science**, 1991. **253**(5019): p. 557-60.
88. Asturias, J.A., Ibarrola, I., Fernández, J., Arilla, M.C., González-Rioja, R., and Martínez, A. Phod 2, a major allergen from date palm pollen, is a profilin: cloning, sequencing, and immunoglobulin E cross-reactivity with other profilins. **Clin Exp Allergy**, 2005. **35**(3): p. 374-81.
89. López-Torrejón, G., Crespo, J.F., Sánchez-Monge, R., Sánchez-Jiménez, M., Álvarez, J., Rodríguez, J., and Salcedo, G. Allergenic reactivity of the melon profilin Cuc m 2 and its identification as major allergen. **Clin Exp Allergy**, 2005. **35**(8): p. 1065-72.
90. López-Torrejón, G., Ibáñez, M.D., Ahrazem, O., Sánchez-Monge, R., Sastre, J., Lombardero, M., Barber, D., and Salcedo, G. Isolation, cloning and allergenic reactivity of natural profilin Cit s 2, a major orange allergen. **Allergy**, 2005. **60**(11): p. 1424-9.
91. Rihs, H.P., Chen, Z., Ruëff, F., Petersen, A., Rozynek, P., Heimann, H., and Baur, X. IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. **J Allergy Clin Immunol**, 1999. **104**(6): p. 1293-301.
92. Sirvent, S., Palomares, O., Vereda, A., Villalba, M., Cuesta-Herranz, J., and Rodríguez, R. nsLTP and profilin are allergens in mustard seeds: cloning, sequencing and recombinant production of Sin a 3 and Sin a 4. **Clin Exp Allergy**, 2009. **39**(12): p. 1929-36.
93. Tordesillas, L., Pacios, L.F., Palacín, A., Cuesta-Herranz, J., Madero, M., and Díaz-Perales, A. Characterization of IgE epitopes of Cuc m 2, the major melon allergen, and their role in cross-reactivity with pollen profilins. **Clin Exp Allergy**, 2010. **40**(1): p. 174-81.
94. Radauer, C. and Breiteneder, H. Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. **J Allergy Clin Immunol**, 2006. **117**(1): p. 141-7.
95. Ledesma, A., Barderas, R., Westritschnig, K., Quiralte, J., Pascual, C.Y., Valenta, R., Villalba, M., and Rodríguez, R. A comparative analysis of the cross-reactivity in the polcalcin family including Syr v 3, a new member from lilac pollen. **Allergy**, 2006. **61**(4): p. 477-84.
96. Ledesma, A., Gonzalez, E., Pascual, C.Y., Quiralte, J., Villalba, M., and Rodríguez, R. Are Ca²⁺-binding motifs involved in the immunoglobulin E-binding of allergens? Olive pollen allergens as model of study. **Clin Exp Allergy**, 2002. **32**(10): p. 1476-83.
97. Garmatiuk, T., Swoboda, I., Twardosz-Kropfmüller, A., Dall'antonia, F., Keller, W., Singh, M.B., Bhalla, P.L., Okada, T., Toriyama, K., Weber, M., Ghannadan, M., Sperr, W.R., Blatt, K., Valent, P., Klein, B., Niederberger, V., Curin, M., Balic, N., Spitzauer, S., and Valenta, R. Characterization of mutants of a highly cross-reactive calcium-binding protein from *Brassica* pollen for allergen-specific immunotherapy. **Immunobiology**, 2013. **218**(9): p. 1155-65.
98. Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D., and Tsernoglou, D. Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. **Plant Cell**, 2005. **17**(3): p. 849-58.
99. Barderas, R., García-Sellés, J., Salamanca, G., Colás, C., Barber, D., Rodríguez, R., and Villalba, M. A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola kali*) pollen. **Clin Exp Allergy**, 2007. **37**(7): p. 1111-9.
100. Chye, M.L. and Cheung, K.Y. beta-1,3-Glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant Mol Biol**, 1995. **29**(2): p. 397-402.
101. Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F., and Rodríguez, R. 1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity. **Clin Exp Allergy**, 2005. **35**(3): p. 345-51.
102. Hadfield, K.A. and Bennett, A.B. Polygalacturonases: many genes in search of a function. **Plant Physiol**, 1998. **117**(2): p. 337-43.
103. Davies, J.M., Voskamp, A., Dang, T.D., Pettit, B., Loo, D., Petersen, A., Hill, M.M., Upham, J.W., Rolland, J.M., and O'Hehir, R.E. The dominant 55 kDa allergen of the subtropical Bahia grass (*Paspalum notatum*) pollen is a group 13 pollen allergen, Pas n 13. **Mol Immunol**, 2011. **48**(6-7): p. 931-40.
104. Ibarrola, I., Arilla, M.C., Martínez, A., and Asturias, J.A. Identification of a polygalacturonase as a major allergen (Pla a 2) from *Platanus acerifolia* pollen. **J Allergy Clin Immunol**, 2004. **113**(6): p. 1185-91.

105. Suck, R., Petersen, A., Hagen, S., Cromwell, O., Becker, W.M., and Fiebig, H. Complementary DNA cloning and expression of a newly recognized high molecular mass allergen phl p 13 from timothy grass pollen (*Phleum pratense*). **Clin Exp Allergy**, 2000. **30**(3): p. 324-32.
106. Namba, M., Kurose, M., Torigoe, K., Hino, K., Taniguchi, Y., Fukuda, S., Usui, M., and Kurimoto, M. Molecular cloning of the second major allergen, Cry j II, from Japanese cedar pollen. **FEBS Lett**, 1994. **353**(2): p. 124-8.
107. Petersen, A., Dresselhaus, T., Grobe, K., and Becker, W.M. Proteome analysis of maize pollen for allergy-relevant components. **Proteomics**, 2006. **6**(23): p. 6317-25.
108. Díaz-Perales, A., Lombardero, M., Sánchez-Monge, R., García-Selles, F.J., Pernas, M., Fernández-Rivas, M., Barber, D., and Salcedo, G. Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross-reactivity among proteins of *Artemisia* pollen, *Castanea* nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. **Clin Exp Allergy**, 2000. **30**(10): p. 1403-10.
109. Hiller, K.M., Lubahn, B.C., and Klapper, D.G. Cloning and expression of ragweed allergen Amb a 6. **Scand J Immunol**, 1998. **48**(1): p. 26-36.
110. Bernardi, M.L., Giangrieco, I., Camardella, L., Ferrara, R., Palazzo, P., Panico, M.R., Crescenzo, R., Carratore, V., Zennaro, D., Liso, M., Santoro, M., Zuzzi, S., Tamburrini, M., Ciardiello, M.A., and Mari, A. Allergenic lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: the kiwifruit LTP as a model. **PLoS One**, 2011. **6**(11): p. e27856.
111. Lauer, I., Miguel-Moncin, M.S., Abel, T., Foetisch, K., Hartz, C., Fortunato, D., Cistero-Bahima, A., Vieths, S., and Scheurer, S. Identification of a plane pollen lipid transfer protein (Pla a 3) and its immunological relation to the peach lipid-transfer protein, Pru p 3. **Clin Exp Allergy**, 2007. **37**(2): p. 261-9.
112. Lombardero, M., García-Sellés, F.J., Polo, F., Jimeno, L., Chamorro, M.J., García-Casado, G., Sánchez-Monge, R., Díaz-Perales, A., Salcedo, G., and Barber, D. Prevalence of sensitization to *Artemisia* allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa. Cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. **Clin Exp Allergy**, 2004. **34**(9): p. 1415-21.
113. Lewis, N.G., Kato, M.J., Lopes, N., and Davin, L.B. Lignans - Diversity, Biosynthesis, and Function. **Acc Sym Ser**, 1995. **588**: p. 135-167.
114. Vieths, S., Frank, E., Scheurer, S., Meyer, H.E., Hrazdina, G., and Haustein, D. Characterization of a new IgE-binding 35-kDa protein from birch pollen with cross-reacting homologues in various plant foods. **Scand J Immunol**, 1998. **47**(3): p. 263-72.
115. Jiménez-López, J.C., Kotchoni, S.O., Hernández-Soriano, M.C., Gachomo, E.W., and Alché, J.D. Structural functionality, catalytic mechanism modeling and molecular allergenicity of phenylcoumaran benzylic ether reductase, an olive pollen (Ole e 12) allergen. **J Comput Aided Mol Des**, 2013. **27**(10): p. 873-95.
116. Karamloo, F., Wangorsch, A., Kasahara, H., Davin, L.B., Haustein, D., Lewis, N.G., and Vieths, S. Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables. **Eur J Biochem**, 2001. **268**(20): p. 5310-20.
117. Gómez-Casado, C., Garrido-Arandia, M., Gamboa, P., Blanca-López, N., Canto, G., Varela, J., Cuesta-Herranz, J., Pacios, L.F., Díaz-Perales, A., and Tordesillas, L. Allergenic Characterization of New Mutant Forms of Pru p 3 as New Immunotherapy Vaccines. **Clin Dev Immunol**, 2013. **2013**: p. 385615.
118. Jiménez-López, J.C., Rodríguez-García, M.I., and Alché, J.D. Analysis of the effects of polymorphism on pollen profilin structural functionality and the generation of conformational, T- and B-cell epitopes. **PLoS One**, 2013. **8**(10): p. e76066.
119. Osterballe, M., Hansen, T.K., Mortz, C.G., Høst, A., and Bindslev-Jensen, C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. **Pediatr Allergy Immunol**, 2005. **16**(7): p. 567-73.
120. Green, M.R. and Sambrook, J., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th ed, 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
121. Calabozo, B., Díaz-Perales, A., Salcedo, G., Barber, D., and Polo, F. Cloning and expression of biologically active *Plantago lanceolata* pollen allergen Pla l 1 in the yeast *Pichia pastoris*. **Biochem J**, 2003. **372**(Pt 3): p. 889-96.
122. Villalba, M., Rodríguez, R., and Batanero, E. The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment. **Methods**, 2013.
123. Letrán, A., Espinazo, M., and Moreno, F. Measurement of IgE to pollen allergen components is helpful in selecting patients for immunotherapy. **Ann Allergy Asthma Immunol**, 2013. **111**(4): p. 295-7.

124. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J., and Goodman, H.M. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences. **Science**, 1977. **196**(4296): p. 1313-9.
125. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 1951. **193**(1): p. 265-75.
126. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
127. D.B., W. Ultraviolet spectra of proteins and amino acids. **Adv. Prot. Chem**, 1962. **17**: p. 303.
128. Wilkins, M.R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R.D., and Hochstrasser, D.F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Mol Biol**, 1999. **112**: p. 531-52.
129. Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res**, 2003. **31**(13): p. 3784-8.
130. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. **J Mol Graph**, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
131. Towbin H., L.J., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Natl. Acad. Sci. USA**, 1979. **76**: p. 4350.
132. Douladiris, N., Savvatanos, S., Roumpedaki, I., Skevaki, C., Mitsias, D., and Papadopoulos, N.G. A molecular diagnostic algorithm to guide pollen immunotherapy in southern europe: towards component-resolved management of allergic diseases. **Int Arch Allergy Immunol**, 2013. **162**(2): p. 163-72.
133. Scheurer, S. Improvement of the diagnosis of allergy by using purified allergens. **Clin Exp Allergy**, 2006. **36**(12): p. 1483-6.
134. Lidholm, J., Ballmer-Weber, B.K., Mari, A., and Vieths, S. Component-resolved diagnostics in food allergy. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, 2006. **6**(3): p. 234-40.
135. Singh, B., Sharma, G.L., Oellerich, M., Kumar, R., Singh, S., Bhadoria, D.P., Katyal, A., Reichard, U., and Asif, A.R. Novel cytosolic allergens of *Aspergillus fumigatus* identified from germinating conidia. **J Proteome Res**, 2010. **9**(11): p. 5530-41.
136. Goliáš, J., Humlová, Z., Halada, P., Hábová, V., Janatková, I., and Tučková, L. Identification of Rice Proteins Recognized by the IgE Antibodies of Patients with Food Allergies. **J Agric Food Chem**, 2013. **61**(37): p. 8851-60.
137. Li, X., Wei, L., Jia, L., Li, M., Zhu, L., Liu, L., and Gao, Y. Identification and characterization of cow's milk proteins from the rat intestinal lymph using a proteomic strategy. **Proteomics**, 2013. **13**(17): p. 2649-56.
138. Marzban, G., Herndl, A., Maghuly, F., Katinger, H., and Laimer, M. Mapping of fruit allergens by 2D electrophoresis and immunodetection. **Expert Rev Proteomics**, 2008. **5**(1): p. 61-75.
139. Assarehzadegan, M.A., Sankian, M., Jabbari, F., Noorbakhsh, R., and Varasteh, A. Allergy to *Salsola Kali* in a *Salsola incanescens*-rich area: role of extensive cross allergenicity. **Allergol Int**, 2009. **58**(2): p. 261-6.
140. Almogren, A. Airway allergy and skin reactivity to aeroallergens in Riyadh. **Saudi Med J**, 2009. **30**(3): p. 392-6.
141. Altmann, F. The role of protein glycosylation in allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, 2007. **142**(2): p. 99-115.
142. Cuesta-Herranz, J., Barber, D., Blanco, C., Cistero-Bahima, A., Crespo, J.F., Fernández-Rivas, M., Fernández-Sánchez, J., Florido, J.F., Ibáñez, M.D., Rodríguez, R., Salcedo, G., García, B.E., Lombardero, M., Quiralte, J., Rodríguez, J., Sánchez-Monge, R., Vereda, A., Villalba, M., Alonso Díaz de Durana, M.D., Basagana, M., Carrillo, T., Fernández-Nieto, M., and Tabar, A.I. Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy. **Int Arch Allergy Immunol**, 2010. **153**(2): p. 182-92.
143. Metz-Favre, C., Papanikolaou, I., Purohit, A., Pauli, G., and de Blay, F. The reality of ash pollinosis. **Rev Fr Allergol**, 2010. **50**(7): p. 568-573.
144. Hemmer, W., Focke, M., Wantke, F., Götz, M., Jarisch, R., Jäger, S., and Götz, M. Ash (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1. **Allergy**, 2000. **55**(10): p. 923-930.
145. Jiménez-López, J.C., Morales, S., Castro, A.J., Volkmann, D., Rodríguez-García, M.I., and Alché, J.D. Characterization of profilin polymorphism in pollen with a focus on multifunctionality. **PLoS One**, 2012. **7**(2): p. e30878.

